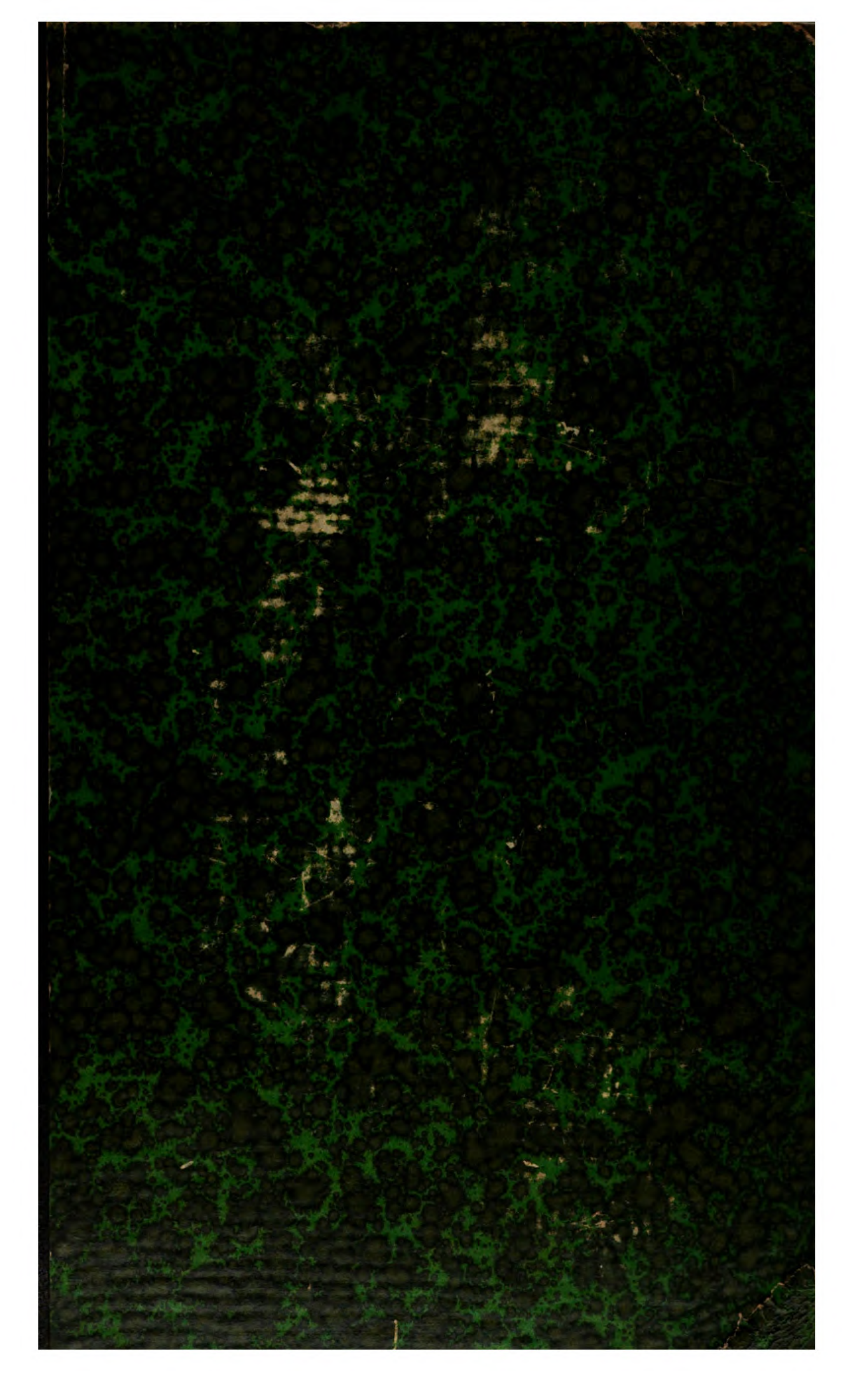
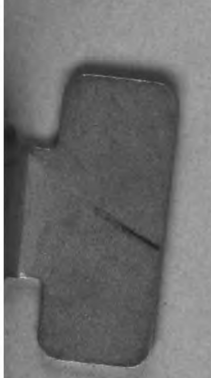
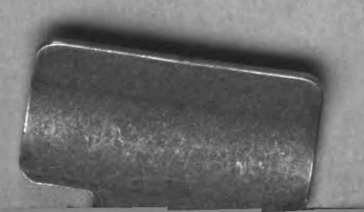
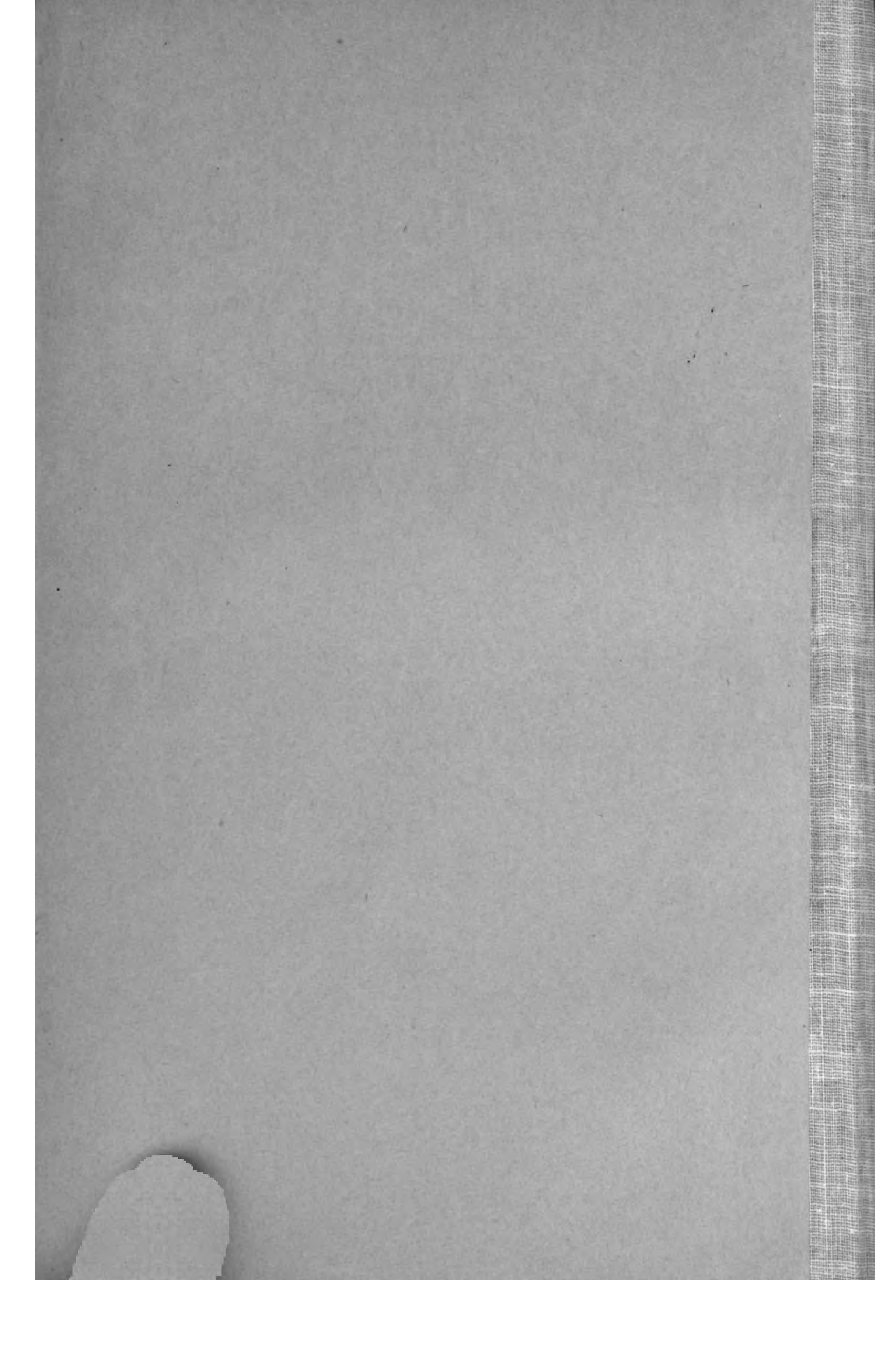
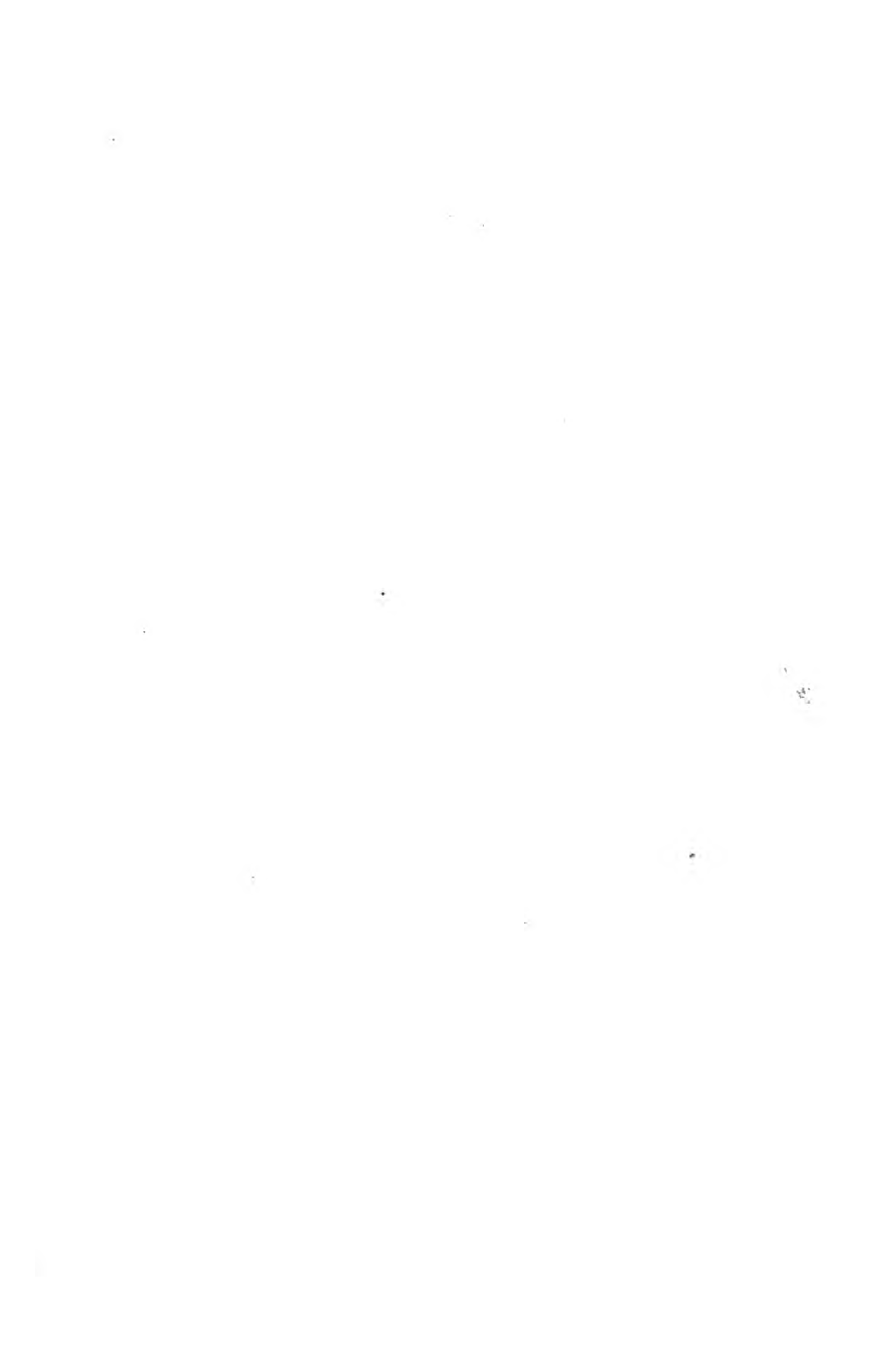












CENTRALBLATT

für

Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten

In Verbindung mit

Prof. Dr. R. Abel, Geh. Obermed.-Rat in Jena
Prof. Dr. M. Braun, Geh. Reg.-Rat in Königsberg
Prof. Dr. R. Pfeiffer, Geh. Med.-Rat in Breslau

herausgegeben von

Prof. Dr. O. Uhlworm, Geh. Reg.-Rat in Bamberg
Präsident Dr. A. Weber in Dresden

und

Prof. Dr. E. Gildemeister, Ober-Reg.-Rat, Berlin-Lichterfelde-W.

Erste Abteilung. 94. Band

Medizinisch-hygienische Bakteriologie und tierische Parasitenkunde

Originale

Mit 44 Abbildungen im Text und 11 Tafeln



Jena

Verlag von Gustav Fischer

1925



Centralbl. f. Bakt. etc. I. Abt. Originale. Bd. 94. Heft 1.

Ausgegeben am 20. Januar 1925.

Beobachtungen bei Erkrankungen durch Paratyphus B (Schottmüller-Bazillen) und durch Fleischvergifter (Breslau-Bazillen).

Von Dr. **Hage,**
früher Leiter der Bakteriol. Unters.-Anstalt für die Typhusbekämpfung beim Hygienischen Institut der Universität Jena.

Mit 1 Kurve im Text.

I. Teil.

Epidemiologisches.

Die nachstehenden Beobachtungen sind in der Zeit der verstärkten Typhusbekämpfung in Mitteldeutschland während der Jahre 1921—1923 gemacht. Die Typhusbekämpfung in der verstärkten Form ist eingestellt, die Arbeiten sind daher zu einem unvorhergesehenen Abschluß gelangt. Sie können also kein geschlossenes Ganze bilden. Da aber einzelne Feststellungen von Wichtigkeit sind, sollen sie auch in der unvollendeten Form herausgegeben werden.

In Jena ist seit der Einrichtung der Anstalt dem Vorkommen des Paratyphus B in seiner typhösen sowie seiner gastroenteritischen Art besondere Beachtung geschenkt, trotzdem der Paratyphus B nicht zum eigentlichen Arbeitsgebiet der Anstalt gehören sollte. Es ist versucht, die beiden Arten durch bakteriologische und serologische Methoden sowie durch klinische und epidemiologische Feststellungen auseinander zu halten.

Ganz so selten, wie Neufeld (D. M. W. 1924, Nr. 1) annimmt, ist der Paratyphus B in Deutschland nicht. In seiner typhösen Form wurde er im Arbeitsgebiet der Anstalt Jena, das die Stadtkreise Weimar, Jena und Apolda sowie die Landkreise Jena-Roda, Rudolstadt, Saalfeld, Sonneberg, Weimar, die Kreisabteilung Camburg sowie den preußischen Kreis Naumburg mit rund 500000 Menschen umfaßte, doch öfter beobachtet (61 Fälle), obwohl von einem besonders häufigen Vorkommen, im Gegensatz zu anderen Landesteilen Deutschlands, z. B. Schleswig-Holstein, nicht gesprochen werden kann.

Verteilung des Typhus und Paratyphus B auf die Jahre 1921—1923:

Jahr							
1921	Typhus	375[1]),	Paratyphus B	36,	Fleischvergiftung durch Paratyphus B-Bazillen		2
1922	„	87,	„	2,	„	„	1
1923	„	173,	„	23,	„	„	15

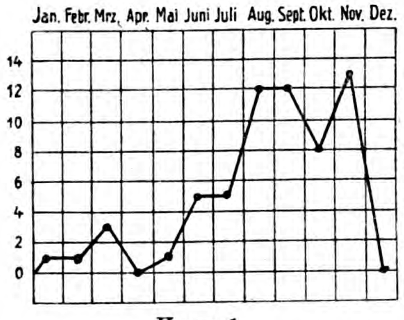
Die Zahlen für die Fleischvergiftung geben nicht die vorgekommenen Fälle, sondern nur die in der Anstalt untersuchten wieder. Es kam nur immer ein Bruchteil der Fälle in ärztliche Behandlung und von dieser wieder nur ein Teil zur Meldung und damit zur Kenntnis der Anstalt. Aus den Jahresberichten des Hygienischen In-

1) Die Zahl ist besonders hoch durch eine örtliche Epidemie mit 156 Fällen.

stitutes Jena, soweit sie mir zugänglich waren, für die früheren Jahre ist nicht die Zahl der vorgekommenen Typhus- und Paratyphus B-Erkrankungen ersichtlich, sondern nur die Zahl der Untersuchungen. Trotzdem geben diese Zahlen wenigstens einen Anhalt, dafür, daß die Verteilung eine ähnliche gewesen sein muß.

Es fanden sich:

1909: 71 positive Typhus-, 2 positive Paratyphuskulturen
1910: 146 „ „ 17 „ „
1913: 338 „ „ 22 „ „
1914: 249 „ „ 12 „ „
1915: Typhus und Paratyphus nicht getrennt
1917/18: 567 positive Typhus-, 33 positive Paratyphuskulturen
1619: nicht getrennt.



Kurve 1.

Verteilung auf die einzelnen Monate:

	Jan.	Febr.	März	April	Mai	Juni	Juli	Aug.	Sept.	Okt.	Nov.	Dez.	
1921	.	1	1	.	1	2	4	6	4	6	12	.	37
1922	1	.	.	.	.	1	.	.	.	.	.	.	2
1922	.	.	2	.	.	2	1	6	8	2	1	.	22
	1	1	3	.	1	5	5	12	12	8	13	.	61

Es erhellt hieraus einmal, daß bei stärkerem Auftreten von Typhuserkrankungen in einem Jahre auch der Paratyphus B in seiner typhösen Form häufiger ist, und zweitens, daß eine auffallende Aehnlichkeit in jahreszeitlichem Vorkommen beider Erkrankungen besteht. Mithin kann der Schluß gezogen werden, daß die Bedingungen, unter denen diese Krankheiten entstehen, auch ähnliche sein müssen.

Familiäres Auftreten von Paratyphus B wurde festgestellt:

1921 2 Fälle in L. 2 Geschwister,
2 „ „ P. Vater und Sohn,
3 „ „ E. Ehepaar und Dienstmädchen,
6 „ „ W. 6 Geschwister,
1922 —
1923 2 „ „ D. Mutter und Tochter.

An demselben Orte ohne nachweislichen Zusammenhang.

In J. 1921 2 Fälle im Juli,
„ „ 1921 1 Fall im September,
„ „ 1923 2 Fälle im März,
„ „ 1923 1 Fall im August,
„ „ 1923 3 Fälle im September.

In W. 1921 1 Fall im August,
„ W. 1921 1 „ „ September,
„ W. 1921 8 Fälle im November,
„ W. 1923 2 „ „ August,
„ Gr. 1921 1 Fall,
„ „ 1923 1 „

Die übrigen Erkrankungen verteilten sich auf ganz verschiedene Ortschaften (s. tabellarische Zusammenstellung auf S. 3).

Auffallend ist die hohe Beteiligung der Kinder im Alter bis zu 10 Jahren.

Eine ähnliche Beobachtung hat Capeller (D. M. W. 1924, Nr. 18) in Königsberg bei einer Epidemie gemacht, bei der besonders häufig

Insgesamt waren 61 Personen erkrankt, davon 25 ♂, 36 ♀.

		♂	♀		
Kinder	unter 2 Jahren:	1	1		
„	von 2— 6 „	2	3	15	21
„	„ 6—10 „	3	5		
„	„ 10—15 „	3	5		
Erwachsene	„ 15—20 „	4	5		
„	„ 20—25 „	1	4		
„	„ 25—30 „	2	3		
„	„ 30—35 „	2	2		
„	„ 35—40 „	—	2		
„	„ 40—45 „	1	3		
„	„ 45—50 „	2	2		
„	„ 50-55 „	2	2		
„	„ 55—60 „	2	1		
„	„ 60 u. mehr „	—	—		
		25	36		

Säuglinge und junge Kinder ergriffen waren, ebenso berichtet Lehfeld (D. M. W. 1924, Nr. 6) über Paratyphus B-Erkrankungen im Säuglings- und frühesten Kindesalter. Capeller nimmt an, daß es sich um Erreger handelte, die für Erwachsene wenig virulent waren, vielmehr nur in ganz jungen Körpern jungfräulichen Boden fanden, wo sie haften konnten. Es soll hierauf später noch eingegangen werden. Wie beim Typhus muß auch beim Paratyphus B mit einer besonderen Beteiligung des Kindesalters gerechnet werden, in welchem beide Erkrankungen ohne auffallende Symptome verlaufen und daher zur Weiterverbreitung besonders Veranlassung geben können. Es sei schon an dieser Stelle darauf hingewiesen, daß auch bei Erwachsenen der Paratyphus B völlig symptomlos verlaufen kann. Bei einer nicht mehr in der obigen Zusammenstellung verwerteten Hausepidemie in einem Krankenhause wurde eine Person festgestellt, die Paratyphus B-Bazillen im Stuhle und im Blute aufwies, deren Serum Paratyphus B-Bazillen bis 1 : 800 deutlich agglutinierte, und die sich des besten Wohlbefindens erfreute, auch keine, selbst nicht eine schnell vorübergehende Unpäßlichkeit gehabt haben wollte, die aber zur Weiterverbreitung der Krankheit zweifelsohne in erheblichem Maße beigetragen haben mußte.

Von den 61 Fällen, die nach Auffassung der Anstalt durch echte Paratyphus B-(Schottmüller)Bazillen verursacht waren, wurden seitens der Aerzte Proben an die Anstalt eingeschickt zur Untersuchung auf

Typhus 40mal,
Typhus oder Ruhr 1mal,
Ruhr 1mal,
Typhus oder Paratyphus 13mal,
Paratyphus 6mal (davon aber 5mal bei solchen Personen, in deren Umgebung bereits Paratyphuserkrankungen festgestellt waren).

Es zeigt sich schon hierin, daß es sich klinisch fast immer um typhöse Formen gehandelt haben muß.

In 42 Fällen wurden Paratyphusbazillen gezüchtet und in 19 Fällen die Diagnose nur durch den positiven Ausfall der spezifischen Agglutination gestellt. Daß der Anteil der Züchtungen nicht höher war, lag zum Teil mit daran, daß nicht häufig genug Proben eingeschickt wurden; sehr oft begnügten sich die Aerzte mit dem Ausfall der Serumreaktion und sandten keine Stuhlproben ein. 1921 war deshalb das Verhältnis der Züchtungen zur alleinigen Serumreaktion 20 : 16, im Jahre 1923, als die Typhusbekämpfung sich schon besser in Mitteldeutschland eingelebt hatte, 19 : 4.

Um zu sehen, ob sich durch serologische Untersuchung des Patientenserums eine Typhuserkrankung von einer paratyphösen schon bei der 1. Einsendung unterscheiden läßt (der Praktiker glaubt häufig, schon aus der 1. Blutprobe ein entscheidendes Ergebnis verlangen zu können), ist eine Reihe solcher Untersuchungen der Anstalt Jena bei Typhus und Paratyphus B zusammengestellt.

Lag Typhus vor, war die Agglutination für Typhusbazillen einsinnig positiv oder negativ in 75,5 Proz. der Fälle, stark positiv für Typhusbazillen, schwach positiv für Paratyphus B-Bazillen in 18,0 Proz., gleich hoch in 3 Proz. und stärker für Paratyphus B-Bazillen als für Typhusbazillen in 3,5 Proz.

Bei der Mitagglutination von Paratyphus B-Bazillen bei höherem Titer für Typhusbazillen konnte keine einheitliche Regel aufgestellt werden. Es kamen Titer von 1 : 50 für Paratyphus B-Bazillen bei einem Titer für Typhusbazillen von 1 : 800 vor, aber auch ein Verhältnis von 1 : 100 für B zu 1 : 200 für Typhus oder 1 : 50 für B zu 1 : 100 für Typhus. Als höchster Titer einer Mitagglutination wurde 1 : 400 beobachtet, und da war der Titer für Typhus 1 : 1600 und stieg auf 1 : 2400, während gleichzeitig der Titer für B auf 1 : 100 fiel.

Bei gleich hoher oder höherer Mitagglutination konnte durch die Blutkultur schon gleich bei der 1. Einsendung die Diagnose gestellt werden; sonst war eine 2. Untersuchung notwendig, bei der dann die Hauptagglutination deutlich in die Erscheinung trat, als Beispiel möge das Folgende dienen:

Agglutination für Typhusbazillen negativ, für Paratyphus B 1 : 100, Kultur nur Typhusbazillen, 14 Tage später Agglutination für Typhusbazillen 1 : 400, für Paratyphus B 1 : 100.

Bei vorliegendem Paratyphus B war die Agglutination für Paratyphus B-Bazillen einsinnig positiv oder negativ in 46,1 Proz., stark positiv für Paratyphus B, schwach für Typhusbazillen in 11,5 Proz., gleich hoch in 8 Proz. und stärker für Typhus als für Paratyphus B-Bazillen in 34,6 Proz. Hier ist also die Möglichkeit, aus der 1. serologischen Untersuchung eine Fehldiagnose zu stellen, erheblich höher.

Der Beispiele seien folgende genannt:

Fall A. Agglut. für Paratyphus B-Bazillen — , für Typhusbazillen 1 : 50,
5 Tage später für Paraty B-Bazillen 1 : 100, für Typhusbazillen 1 : 50,
eigener Stamm 1 : 100.
Blutkultur: nur Paratyphus B-Bazillen.
Aus dem Stuhl wurden 3mal Paratyphus B-Bazillen gezüchtet, die Kranke war gegen Typhus schutzgeimpft.

Fall B. Agglut. für Paraty B-Bazillen — , für Ty. 1 : 200, Blut- u. Stuhlkult.
6 Tage später für Paraty B-Baz. 1 : 800, „ „ 1 : 200.

Einige Fälle wären, falls nicht die Blut- und Stuhlkultur die richtige Diagnose ermöglicht hätte, beim Unterlassen der 2. serologischen Untersuchung wohl sicher als Typhus angesprochen, zumal sie klinisch das Bild eines Typhus boten. Im allgemeinen aber läßt sich sagen, daß bei mehrfacher Untersuchung die serologische Abgrenzung des Paratyphus B gegen den Typhus nicht schwer ist. Nur wissen muß der Praktiker, daß auch ein anfänglich für die eine oder die andere Krankheit sprechender serologischer Befund durch die Kultur oder eine 2. Blutuntersuchung eine Aenderung erfahren kann; er darf nicht glauben, daß hier sich widersprechende Befunde der Untersuchungsanstalt vorliegen. Wie schon Scheller 1905 (Centralbl. f. Bakt. Bd. 38) hervorhob, ist ja auch eine Fehldiagnose, die durch eine Paratyphus-Mit-

agglutination hervorgerufen ist, vom Standpunkt der Therapie und Prophylaxe nicht allzu bedeutsam, da dem Paratyphus B dieselben klinischen und epidemiologischen Maßnahmen entgegenzusetzen sind, wie dem echten Typhus.

Nach meinen Beobachtungen fand sich eine Mitagglutination von Paratyphus B-Bazillen bei Typhuserkrankungen in 24,6 Proz. der Fälle. Rehberg (Kl. Jahrb. 1912) hat eine Zusammenstellung aus verschiedenen Orten gebracht, danach fand eine solche

Fischer in Kiel (Klin. Jahrb. Bd. 15)	in 40	Proz. der Fälle
Thomas in Posen (Klin. Jahrb. Bd. 17)	„ 37	„ „ „
Hilgermann in Coblenz (Klin. Jahrb. Bd. 20)	„ 8,33	„ „ „
Brion u. Kayser in Straßburg (Dtsch. Arch. f. klin. Med. Bd. 85)	„ 8	„ „ „
v. Drigalski in Saarbrücken (Centralbl. f. Bakt. Abt. I Orig. Bd. 35)	„ 64	„ „ „
Manteufel in München (Münch. med. W. 1905)	„ 30	„ „ „
Grünberg u. Rolley in Leipzig (ebenda. 1905)	„ 70	„ „ „
Korte u. Steinberg in Breslau (ebenda. 1905)	„ 39	„ „ „
Schulz in Frankfurt a. M. (Dtsch. med. W. 1909)	„ 19,7	„ „ „
Rehberg in Trier (Klin. Jahrb. 1912, für die Jahre 1906 bis 1909)	„ 62,3	„ „ „

Oertliche Unterschiede werden bei diesen Untersuchungen sicher eine Rolle spielen, worauf schon Scheller (l. c.) hingewiesen hat. Es kann sein, daß die Mitagglutination des Paraty. B. mit seiner Häufigkeit in einer Gegend zusammenhängt. Eine sehr hohe Zahl gibt v. Drigalski für Saarbrücken an, damit stimmt, wenigstens was die Jahre 1903—1909 angeht, die von Rimpau (Arb. a. d. Kais. Ges. Amt. Bd. 41) für Saarbrücken angegebene Zahl von Paratyphuskranken, die 145 betrug, während die übrigen Anstalten zum Teil erheblich niedrigere Zahlen aufwiesen. Aber z. B. in Schleswig-Holstein ist Paratyphus nicht selten, Fischer hat jedoch für Kiel durchaus nicht die höchste Zahl von Mitagglutination gefunden. Bei meinen Untersuchungen fanden sich auch solche örtliche Unterschiede. Während für den ganzen Bereich der Anstalt 24,6 Proz. Mitagglutinationen gefunden waren, wurden bei einer auf 3 kleine dicht zusammenhängende Ortschaften beschränkten Typhusepidemie mit 58 Kranken 58,6 Proz. Mitagglutinationen festgestellt, Paratyphuserkrankungen waren aber aus diesen Orten nicht bekannt geworden.

Großes Interesse beanspruchen die sicheren Typhusfälle, deren Sera selbst bei mehrfach wiederholter Untersuchung ausschließlich eine heterologe Agglutination für Paratyphus aufweisen. Unter meinem Materiale hat sich ein solcher Fall nicht gefunden, nur ein Fall von Paratyphus, bei dem kulturell Paratyphusbazillen gefunden waren und bei dem die Agglutination zweimal lediglich 1:50 für Typhus ergab, sowie ein zweiter Fall, bei dem ebenfalls Paratyphus B-Bazillen gezüchtet wurden, dessen Serum aber nur Typhusbazillen, und zwar im Verlauf eines Monats bei 5maliger Untersuchung in der Titerhöhe von 1:400 bzw. 1:200 agglutinierte. Steinebach (Niederschrift 1916) erwähnt einen von Thies 1908 beobachteten Fall: Typhusfall, 4mal Widal für Typhus völlig negativ, Paratyphus 1:160 positiv. Intra vitam, Blut und Stuhl Typhusbazillen positiv, post mortem Milz, Leber, Gallenblase positiv; Steinebach selbst hat solche Fälle mehrfach beobachtet, allein 1915 acht derartige. In allen diesen Fällen handelt es sich um klinisch und epidemiologisch einwandfreie Typhen, außerdem gelang in 5 Fällen der Nachweis von Typhusbazillen im Blut oder Stuhl. Steinebach folgert daraus:

„Die praktische Bedeutung der Fälle liegt darin, daß der einseitig positive Ausfall der Gruber-Widalschen Reaktion für Paratyphus in Ermangelung bakteriologischer Resultate durchaus nicht gegen die Diagnose Typhus verwendet werden darf; in allen derartigen Fällen sind die epidemiologischen und klinischen Symptome in weitestem Maße für die Diagnosenstellung heranzuziehen."

Löhr (D. m. W. 1924 Nr. 17) berichtet neuerdings über auffallende Verhältnisse bei der Agglutination des Serums Typhuskranker, spätes Auftreten, abnorme Niedrigkeit für längere Zeit. Bei Paratyphuskranken habe ich dies Verhalten des Serums nicht feststellen können. Nach Löhr beruht die schwere Agglutinierbarkeit „auf uns bisher unbekannten (klimatischen?) Faktoren, oder aber wir müssen eine veränderte Reaktion des erkrankten Organismus in der heutigen Zeit annehmen; möglicherweise besteht ein Zusammenhang mit den stark schädigenden Einflüssen der Kriegsjahre (unzureichende, vitaminarme Kost usw.), wodurch die Antikörper bildende Funktion des Organismus gelitten hat." Hierzu möchte ich eine mir mündlich übermittelte Beobachtung der russischen Privatdozentin Frau Dr. Nesmielow mitteilen, die bei einer großen Zahl Typhuskranker in den Hungerjahren besonders bei Kindern die gleiche Feststellung wie Löhr gemacht hat. Daß in Thüringen nicht Aehnliches gefunden wurde, liegt wohl mit daran, daß die Untersuchungen in die Nachkriegszeit fallen und die Kranken größtenteils der ländlichen Bevölkerung angehörten, die in bezug auf Ernährung immer noch günstiger gestellt war, als die Großstädter.

Experimentelle Bewertung der Choleravakzinationsmethode per os.

[Aus dem Mikrobiologischen Institut des Volkskommissariats für Gesundheitswesen (Direktor: Prof. W. Barikin).]

Von **S. Klüchin** und **G. Vigodtschikoff**, Moskau.

Die Tatsache einer Immunisierungsmöglichkeit auf dem Digestionswege ist in der Literatur schon seit langer Zeit bekannt. 1880 veröffentlichten Pasteur, Chamberland und Roux ihre Versuchsergebnisse über Fütterung von Hühnern mit Erregern der Hühnercholera. Die oral infizierten Hühner, welche am Leben blieben, erwiesen sich nach überstandener Infektion als immun. Ehrlich gelang bei Tieren die orale Immunisierung gegen pflanzliche Gifte. In späterer Zeit versuchte eine ganze Reihe von Autoren an Mensch und Tier dasselbe Immunisationsverfahren gegen Typhus, Paratyphus, Cholera, Pest, Dysenterie und Tuberkulose. Marcatelli stellte 1901 an Meerschweinchen Immunisierungsversuche gegen Pest an, die aber wenig Erfolg hatten. Wakulenko immunisierte 1903 Tiere gegen Typhus und Cholera. Loeffler machte 1906 gleichfalls Immunisierungsversuche an Mäusen mit Bac. typhi murium, Calmette, Guérin und Bréton versuchten 1907 die Immunisierung von Tieren gegen Tuberkulose. 1905—1907 gelang es Shiga, bei Immunisierungsversuchen per os gegen Dysenterie bei Tieren und Menschen günstige Resultate zu erzielen. Ssawtschenko und Sabolotny führten eine perorale Vakzination gegen Cholera an sich selber aus. Metschnikoff und Besredka machten 1911 Vakzinationsversuche per os gegen Typhus an Affen. Lumière und Chevrotier versuchten 1915 eine Immunisierung mit abgetöteten Kulturen, die in Keratinkapseln per os eingeführt wurden. Nach den Angaben der Mehrzahl aller Autoren wurden die wenigen günstigen Ergebnisse nur im Falle

einer Verfütterung von lebendem Virus erzielt. Positive Resultate ergaben nur die Vakzinationsversuche mit abgetöteten Kulturen bei Dysenterie. Deshalb fand die Methode der Immunisierung per os keine ausgedehntere Anwendung. Besredka gelangte im Jahre 1918 bei der Durchsicht und Prüfung der vorhergegangenen Arbeiten auf dem Gebiete der peroralen Vakzination gegen Dysenterie, Typhus und Paratyphus zu der Ansicht, daß die Mißerfolge der früheren Versuche dadurch zu erklären wäre, daß die per os eingeführten Mikroben bei normalem Verhalten des Darmwandepithels nicht resorbiert werden. Nur in Fällen, wo der Erreger die Eigenschaft besitzt, den Darmschleim aufzulösen und das Epithel zu schädigen (wie z. B. der Ruhrerreger), gelingt die Vakzination per os selbst mit abgetöteten Erregern leicht. Bei einer Vakzination per os gegen Abdominaltyphus oder Paratyphus B ist eine vorherige Durchdringung oder Zerstörung der Schleimschicht oder des Schleimhautepithels des Darmes notwendig. Besredka hat deshalb empfohlen, den Versuchstieren vor der Einführung der Vakzine eine bestimmte Dosis Rindergalle (5—8 ccm) per os zu geben. Die nach dieser Methode ausgeführten Versuche ergaben positive Resultate und die nach dem Rezept von Besredka hergestellten ausgetrockneten, abgetöteten Bakterienkulturen sind in einzelnen Ländern zu Immunisierungszwecken praktisch verwendet worden. Die in der Fachpresse veröffentlichten Ergebnisse der Besredka-Vakzinationsversuche wurden bei uns in Rußland, wo die Methoden der prophylaktischen Medizin den Kernpunkt aller Seuchenbekämpfungsmaßnahmen bilden, mit einem begreiflichen Interesse, sogar mit einer gewissen Begeisterung aufgenommen. In der Tat ist die praktische Anwendung der subkutanen Impfungen nach Kolle, obgleich sich diese im Verlauf vieler Jahre glänzend bewährte, bei Massenimpfungen mit einer Reihe von leicht verständlichen Nachteilen und Unbequemlichkeiten verknüpft, die bei der Besredka-Methode wegfallen. Die Vakzinationsmethode per os, wie sie von Besredka vorgeschlagen wurde, ist in experimenteller Beziehung noch nicht in genügendem Maße erforscht. Die genauere Bestimmung der Menge des per os eingeführten und durch den Darm aufgenommenen Antigens, die Wirkungskreise der Galle auf die Darmschleimhaut bedarf ebenso noch einer Klärung, wie eine ganze Reihe von anderen Fragen (Verhalten der Darmwand, die Beziehungen zwischen Darmflora und Organismus in Zusammenhang mit der Einwirkung der eingeführten Galle usw.), — Fragen, die bei jedem, der sich mit dieser Methode genauer beschäftigte, auftauchten.

Auf Grund dieser Erwägungen machte uns Herr Prof. W. Barikin den Vorschlag, eine experimentelle Prüfung der Vakzinationsmethode per os mit Choleraerregern vorzunehmen und ihre Vorzüge oder Nachteile gegenüber der Kolleschen Methode aufzudecken. Zunächst wurde von uns eine Reihe von Versuchen angestellt, die eine Klärung der Frage herbeiführen sollten, wie sich die normale Schleimhaut in bezug auf Resorption von abgetöteten und lebenden Choleravibrionen verhält.

Einer Serie von Kaninchen von ungefähr gleichem Gewicht und Alter wurde nach vorausgegangener 12—16stünd. Futterentziehung verschiedene große Dosen von abgetöteten Choleravibrionen in verschiedenen Zeitabständen von einer Woche bis zu 2 Monaten vermittels einer Sonde per os eingeführt. Zwei Kaninchen dieser Serie erhielten mit 7tägig. Pausen in 2 Malen je eine 24stünd. Cholerakultur auf Agar, die in 10 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und durch 1stünd. Erhitzen auf 56° abgetötet war. Irgendwelche Störungen wurden im Anschluß an die Fütterung nicht beachtet. Im Serum des Tieres, das 7 Tage nach der letzten Fütterung untersucht wurde, ließen sich keine Agglutinine nachweisen. Ebensolche Resultate ergaben Fütterungsversuche im Laufe eines Monats an 6 Kaninchen, mit verschiedenen Dosen von 3—75 Röhrchen 24stünd. abgetöteter Cholerakulturen. 2 Kaninchen erhielten im Laufe von 3 Tagen je 3 24stünd. abgetötete Cholerakulturen.

Die Kaninchen der 2. Serie erhielten im Verlauf von 18 Tagen mit 1wöchigen Zwischenpausen Dosen von 6—21 Kulturröhrchen von lebenden Choleravibrionen gleichfalls durch Sonde eingeführt. 2 Ka-

ninchen dieser Serie, von denen das eine 6, das andere 10 Kulturröhrchen erhalten hatte, zeigten nach der Fütterung keinerlei Krankheitserscheinungen. 7 Tage darauf ergab das Serum der Tiere einen Agglutinationstiter von 1 : 100, 1 : 200. Ein 3. Kaninchen von 1350 g erhielt in den Tagen vom 21.—24. April 7 Kulturröhrchen mit lebendem Virus. Am 3. 5. war der Agglutinationstiter 1 : 20. Keinerlei krankhafte Störungen. In den Tagen vom 6.—9. Mai wurden nochmals 14 lebende Kulturen eingeführt. 10. 5. Agglutinationstiter 1 : 100. 12. 5. ist das Kaninchen matt, hockt in einer Ecke, nimmt kein Futter, Temperatur unter 36° C. Geringe Darmerscheinungen. Am folgenden Tage Temperatur 38°. 14. 5. Temperatur unter 35°, gegen Abend tot. Bei der Sektion ergab sich das Bild einer Septikämie und Enterokolitis. In den angelegten Kulturen ließen sich Choleravibrionen nicht züchten. Aus Blut und Galle wurde B. coli commune gezüchtet. Die angestellten Versuche lassen also den Schluß zu, daß die abgetöteten Vibrionen durch die normale Schleimhaut nicht aufgenommen werden; irgendwelche Störungen der Darmtätigkeit sind selbst bei Einführung enormer Mengen abgetöteter Vibrionen nicht zu beobachten. Werden lebende Choleravibrionen per os eingeführt, so ist die Resorptionsmöglichkeit bedeutend größer. 10 Kulturröhrchen werden vom Kaninchen ohne merkbare Schädigung vertragen. Höhere Dosen können zum Tode führen, wobei der Tod durch sekundäre Infektion erfolgt. Das Choleratoxin schädigt die Darmschleimhaut und ermöglicht auf diese Weise das Eindringen von anderen Darmbakterien ins Blut.

Eine weitere Frage, deren Lösung wir uns zur Aufgabe stellten, war die, nach der Einwirkungsart der Galle auf die Darmschleimhaut und den sich daraus ergebenden Folgeerscheinungen.

Das 1. und wichtigste Moment im Vakzinationsprozeß per os, wie er von Besredka vorgeschlagen wurde, ist die Vorbereitung der Darmschleimhaut — ihre Sensibilisierung durch Rindergalle. Unter normalen Verhältnissen ist die Darmschleimhaut von einer Schleimschicht bedeckt, die sie vor einer dauernden Einwirkung von seiten der verschiedenartigen zahlreichen Darmbewohner schützt. Besredka ist der Ansicht, daß ein derartiger Zustand des Darmes, der es nicht gestattet, daß per os eingeführte Bakterien in eine direkte Berührung mit der Schleimhaut oberflächlich gelangen, das Tier vor einer experimentellen Infektion schützt. Entfernt man aber auf die oder jene Weise diese schützende Schleimschicht, so wird eine unmittelbare Einwirkung der Bakterien auf die Schleimhaut möglich, und es kommt zu einer Infektion des Tieres. Das Mittel, welches die Schleimentfernung in höchstem Maße bewirkt, ist Rindergalle. Die per os eingeführte Galle ist nicht nur imstande, die Schleimhautoberfläche von dem anhaftenden Schleim zu befreien, sondern sie erweist sich auch als ausgezeichnetes Mittel, um beim Kaninchen die Gallenabsonderung anzuregen. Masaki fügt der Galle noch Abführmittel in Form von Lakritzenpulver hinzu, um auf diese Weise die Wirksamkeit der Galle zu erhöhen. Bei der Ausführung der Darmsensibilisierung mit Rindergalle machten wir bei unsern Kaninchen die Feststellung, daß die Tiere in einigen Fällen diesen ersten Akt der Vakzination nach dem Besredka-Verfahren nicht vertragen — bald nach der Verabfolgung der Galle stellte sich bei

ihnen Durchfall ein, der gelegentlich so stark werden konnte, daß er zum Tode des betreffenden Versuchstieres führte. Zuweilen beobachteten wir derartige Erscheinungen bei Wiederholung der Gallebehandlung. Diese unerwünschten Komplikationen bei den Sensibilisierungsverfahren mit Galle veranlaßten uns, der Frage nachzugehen, welche pathologisch-anatomischen Veränderungen in den erwähnten Fällen vorhanden sind und in welchem Zusammenhang sie mit den Sensibilisierungsvorgängen im Tierkörper stehen. Bei der Erforschung der pathologisch-anatomischen Veränderungen des Darmes infolge der Gallensensibilisierung ist vor allem die eingeführte Menge, die Dosierung der Galle, zu berücksichtigen. Die Menge der im Einzelfall von uns verwendeten Galle belief sich auf 8,0—20,0 ccm täglich. Die Wirkung solcher Dosen läßt sich durch die folgenden 3 Beispiele erläutern.

Kaninchen Nr. 4 (Gewicht 2560,0 g), erhielt an 3 aufeinanderfolgenden Tagen je 20,0 ccm Galle per os. Vom 2. Tage ab trat Durchfall auf, der sich am 3. Tage, an dem das Kaninchen getötet wurde, erheblich verstärkt hatte. Bei der Sektion wurde festgestellt:

Makroskopischer Befund: Das Mesenterium stark hyperämisch. Der Darm aufgetrieben und besonders an den Krümmungen stark hyperämisch. Der Dünndarm mit einer trüben gelblichen Flüssigkeit angefüllt. Die Schleimhaut rosa gefärbt, geschwollen, an einzelnen Stellen mit punktförmigen Blutungen bedeckt. Dickdarm stark hyperämisch mit grünlichen Massen. Rectum nicht verändert. Mesenterialdrüsen stark vergrößert, auf dem Durchschnitt rosa gefärbt. Leber stark hyperämisch. Gallenblase vergrößert, mit dickflüssiger, dunkelgrüner Galle. Uebrige Organe makroskopisch nicht verändert.

Mikroskopischer Befund: Auf der Schleimhautoberfläche des Dünndarms ein Exsudat mit desquamierten Epithelien, Leukozyten, Erythrozyten, nekrotischem Gewebe und Bakterien. Der Epithelsaum hat sich in zusammenhängenden Schichten abgelöst, besonders an den Stellen der Darmkrümmungen. Die Gefäße sind erweitert. Mucosa und Submucosa stellenweise mit punktförmigen Blutungherden übersät. Fleckweise Infiltration der Submucosa. Lymphfollikel stark hyperämisch, Chylusgefäße erweitert. Die Schleimhaut des Dickdarms, besonders im Anfangsteil, stark verändert, an einigen Stellen nekrotisch. An ihrer Oberfläche ein Exsudat aus desquamierten, zerfallenden Epithelien, Leukozyten und Bakterien. Die Gefäße der Submucosa erweitert, in der Submucosa kleine Blutungsherde und kleinzellige Infiltrationen.

Bakteriologischer Befund: Im Schleimhautgewebe, in der Submucosa, in den Lymphgefäßen, finden sich in größerer Anzahl verschiedenartige Bakterien. Eine Viertelstunde vor dem Tode des Versuchstieres aus dem Herzblut angelegte Kultur ergab B. Coli commune in Reinkultur.

Kaninchen Nr. 21, Gewicht 1730,0 g, erhielt an 2 aufeinanderfolgenden Tagen je 15,0 Galle. Vom 1. Tage ab trat Durchfall auf, am 3. Tage wurde das Tier getötet.

Die Autopsie ergab die gleichen makro- und mikroskopischen Veränderungen wie bei Kaninchen 4. Im oberen Abschnitte des Dickdarms war die Schleimhaut völlig zerstört, an zwei Stellen fanden sich hier Geschwürbildungen mit unterminierten, stark infiltrierten Rändern, die bis in die submukösen Schicht hineinreichten.

Bakteriologisch blieb die einige Minuten vor dem Tode des Tieres aus dem Herzblut angelegte Kultur steril. Aus den stark vergrößerten Lymphdrüsen der Radix mesenterii ließ sich B. coli commune züchten.

Kaninchen Nr. 11, Gewicht 2500 g, erhielt an 3 aufeinanderfolgenden Tagen je 20,0 Galle per os. Vom 2. Tage ab Durchfall, der allmählich zunimmt, am 4. Tage perorale Einführung einer 24stünd. Agarkultur von B. anthracoides. In 0,85proz. NaCl aufgeschwemmt. Am 15. Tage bei bestehenden starken Durchfällen getötet.

Die Autopsie ergibt makro- und mikroskopisch das schon beschriebene Bild einer akuten Enterocolitis mit Hyperämie der regionären mesenterialen Drüsen, Lebervergrößerung und praller Füllung der Gallenblase.

Bakteriologisch gelang die Reinkultur von B. anthracoides aus dem Herzblut.

Die gleichen Resultate wurden auch an vielen anderen Kaninchen erzielt, die mit 10,0 und 8,0 Galle behandelt wurden. Die Toleranz

gegenüber Rindergalle ist bei Kaninchen individuell verschieden und kann nicht vorausgesehen werden. Bei einer Dosierung von 10,0 bis 8,0 kommt es bei manchen Tieren zu so erheblichen pathologisch-anatomimischen Veränderungen, wie sie bei anderen erst durch Verabreichung von 15,0 und 20,0 Galle hervorgerufen werden. Dieser Umstand erklärt sich daraus, daß zu der sensibilisierenden Wirkung der eingeführten Galle, deren Menge bekannt ist, noch die Wirkung der durch die eigene Leber des Tieres in reichlichen Mengen produzierten Galle hinzukommt, deren Menge sich natürlich einer Berechnung entzieht, und von der Reaktionsfähigkeit der Leber auf die eingeführte Galle abhängig ist (sensibilisierender Einfluß der Galle auf die Leber, die bereits von Besredka beobachtet wurde).

Aus den Sensibilisierungsversuchen mit Galle an Kaninchen geht also hervor, daß die Menge der zur Sensibilisierung erforderlichen und gleichzeitig für das Tier unschädlichen Rindergalle nicht genau zu bestimmen ist, da ein und dieselbe Dosis bei Kaninchen von gleichem Gewicht einen durchaus verschiedenartigen Effekt haben kann. Bei einem Kaninchen reicht sie vielleicht zu einer Sensibilisierung nicht aus, bei einem andern ruft sie Darmveränderungen hervor, die zum Tode des Versuchstieres durch Autoinfektion führen. Auf Grund dieser Tatsachen sind wir zu der Anschauung gelangt, daß Rindergalle als Mittel zur Sensibilisierung des Darmes keineswegs harmlos und beim Kaninchen keineswegs immer zuverlässig ist.

Eine weitere Frage, die durch Besredka und Sanarelli in den Vordergrund des Interesses gerückt ist, bezieht sich auf den Enterotropismus der Choleravibrionen. Nicati und Rietsch, ferner auch Thomas beobachteten eine Darminfektion nach der Einführung des Choleravirus ins Blut. Die von uns an Kaninchen ausgeführten Versuche, bei denen die Tiere $^1/_2$—1 Röhrchen 24stünd. Agarkultur entweder in die Ohrvene oder in die Bauchhöhle injiziert bekamen, überzeugten uns davon, daß die Choleraerreger in der Tat unabhängig von der Art der Einführung in den Organismus stets Krankheitserscheinungen von seiten des Darmes hervorrufen und zu schweren lokalen Veränderungen des Schleimhautepithels mit allen Anzeichen einer akuten Enterocolitis führen. Das Tier geht unter den Erscheinungen von profusen Durchfällen, Atemnot, Prostration und Kollaps zugrunde. In einzelnen seltenen Fällen gelang die Kultur des Choleraerregers nicht nur aus dem Darm, sondern auch aus der Gallenblase.

Die Ergebnisse unserer Versuche stimmen also mit den Angaben von Besredka, Sanarelli und anderen überein und bestätigen die Affinität des Choleraerregers zu der Darmwand (Enterotropismus).

Die bisher beschriebenen Vorversuche beweisen auf Grund der angeführten Tatsachen 1) daß durch Erhitzen abgetötete Cholerakulturen von der normalen Kaninchendarmwand nicht aufgenommen werden, — 2) daß die Kaninchendarmwand eine gewisse Aufnahmefähigkeit gegenüber lebenden Cholerakulturen besitzt, da die Schleimhaut durch die Einwirkung des Choleravirus geschädigt wird, — 3) daß Rindergalle in der Menge von 8,0—20,0 ccm bei Versuchstieren eine schwere Schädigung der Darmwand herbeiführen kann, die unter Umständen allein oder durch Hinzutreten sekundärer Infektion vom Darm aus tödlich endigt, — 4) daß die Choleraerreger enterotrop sind.

Unter Erwägung dieser vorläufigen Ergebnisse konnten wir zu der eigentlichen experimenetllen Prüfung des Vakzinationsverfahrens per

os bei gleichzeitigen vergleichenden subkutanen Vakzinationsversuchen nach Kolle übergehen. Zu diesem Zwecke wurden folgende Versuche angestellt:

10 Kaninchen der ersten Versuchsreihe erhielten nach vorausgegangener Futterentziehung durch Sonde 5—10 ccm steriler Rindergalle und gleichzeitig eine Vakzine aus abgetöteten Choleravibrionen in Mengen von 1—20 Röhrchen einer 24stünd. Agarkultur. Am folgenden Tage wurde derselbe Versuch wiederholt, wobei die eine Hälfte der Tiere die gleiche Dosis, die andere Hälfte die doppelte Dosis derselben Vakzine erhielt. Dasselbe wurde auch am 3. Tage wiederholt. Bei einigen Kaninchen stellte sich bereits am 1. Tage, bei den anderen am folgenden Tag starker Durchfall mit Schleimbeimengungen ein, die Temperatur fiel beträchtlich (bis 37—36,5). Nach 2—3 Tagen ließ der Durchfall nach und die Kaninchen erholten sich mit Ausnahme von 3 Kaninchen, bei denen der Tod eintrat. Bei der Sektion ergab sich bei allen 3 Kaninchen starke Hyperämie der Serosa und der Schleimhäute, besonders in den oberen Partien des Darmtraktus. Der flüssige Darminhalt war gallig gefärbt, in dieser Flüssigkeit waren abgestoßene Epithelfetzen sichtbar. Peyersche Plaques geschwollen, Leber stark hyperämisch, Gallenblase erweitert, mit Galle angefüllt, die serösen Häute leicht ikterisch. In den mikroskopischen Präparaten außer starker Hyperämie der Leber ausgesprochenes Bild einer Enterocolitis mit Hyperämie und Schwellung der Peyerschen Plaques und des ganzen lymphatischen Apparates des Darms, in der Submucosa zahlreiche Bakterien. Aus Stuhl, Herzblut und Gallenblase wurde B. coli commune gezüchtet.

4 Kaninchen der 2. Versuchsreihe wurden nach dem Kolleschen Verfahren behandelt. In 7tägigen Zwischenpausen erhielten 2 Kaninchen dreimal eine subkutane Einspritzung von je einer halben, 1 und $1^1/_2$ Oese einer 24stünd. Agarkultur von durch einstündiges Erhitzen auf 56° abgetöteten Choleravibrionen. Die beiden anderen Kaninchen erhielten die doppelte Antigendosis. Alle Tiere vertrugen die Impfung ohne irgendwelche Störung.

7 Tage nach der letzten Vakzineeinspritzung wurde bei den Kaninchen beider Versuchsreihen der Agglutinationstiter festgestellt.

Das Serum von 3 Tieren der ersten Reihe, die 5 ccm Galle erhalten hatten, agglutinierte Choleravibrionen in den Verdünnungen 1:10, 1:20. Der Agglutinationstiter der Tiere, welche 10 ccm Galle erhalten hatten, war höher (1:50, 1:100). Der Agglutinationstiter der Kaninchen der zweiten Versuchsreihe erreichte 1:1200, 1:3000.

2 Wochen nach Beendigung der Vakzinationsbehandlung erhielten die 7 am Leben gebliebenen Kaninchen der ersten und alle Kaninchen der zweiten Versuchsreihe eine doppelte tödliche Dosis lebender Choleravibrionen intraperitoneal eingespritzt. Alle Kaninchen der ersten Serie gingen im Verlauf von 24 Std. unter Erscheinungen von profusen Durchfällen und Kollaps zugrunde, ebenso ein Kontrolltier. Alle 4 Kaninchen der zweiten Serie litten 2—3 Tage an Darmstörungen, die Temperatur war mehr oder weniger herabgesetzt (in einem Fall bis 37°), doch hatten sie bereits am 3. Tage die Infektion überstanden.

Der gleiche Versuch wurde an 2 neuen Versuchsreihen an Kaninchen wiederholt, wobei die Kaninchen der 1. Serie (5) mit steigenden Dosen einer abgetöteten Cholerakultur per os unter gleichzeitigem Sensibilisieren durch Rindergalle, die Kaninchen der zweiten Serie (5) subkutan nach Kolle immunisiert wurden. 2 Wochen nach Beendigung der Behandlung erhielten die Kaninchen beider Versuchsreihen je eine tödliche Dosis Cholerakulturen intraperitoneal. Die per os immunisierten Tiere der ersten Versuchsreihe gingen sämtlich zugrunde. Die subkutan behandelten Tiere der zweiten Versuchsreihe blieben am Leben.

Aus diesen Versuchen ergibt sich, daß selbst bei Zufuhr von enormen Dosen abgetöteter Choleravibrionen beim Vakzinationsverfahren nach Besredka eine Immunisierung der Kaninchen gegen Cholera nicht gelingt. Dagegen erwerben die Tiere, welche nach dem Kolleschen Verfahren mit 400mal kleineren Dosen im Vergleich zu den per os eingeführten immunisiert wurden, eine ausgesprochene Immunität gegenüber einer sicher tödlichen Dosis lebender Cholerakulturen. Die Schädigung der Darmschleimhaut, ihre Sensibilisierung durch Auftreten von Durchfall erhöhen die Resorptionsfähigkeit der Darmwand gegenüber abgetöteten Choleravibrionen nur in unbeträchtlichem Maße. Die systematische Sensibilisierung durch Galle — 10 ccm an drei aufeinanderfol-

genden Tagen — hat nicht immer einen günstigen Ausgang für das Tier. In 3 Fällen beobachteten wir tödlichen Ausgang. Die Sektionsprotokolle weisen darauf hin, daß der Tod durch das Eindringen von Darmmikroben durch das lymphatische System ins Blut erfolgt ist. Nach der Feststellung, daß es mit dem Besredka-Verfahren nicht gelingt, bei Verfütterung von abgetöteten Choleraerregern eine Immunität zu erzeugen, versuchten wir eine Vakzinationsbehandlung mit lebenden Choleravibrionen, wie dies bereits von Masaki ausgeführt wurde. Gleichzeitig wurden vergleichsweise parallele Vakzinationsversuche nach Kolle angestellt:

8 Kaninchen der 1. Versuchsreihe erhielten nach 12stünd. Futterentziehung zweimal 10 ccm Galle durch Sonde und gleichzeitig mit der zweiten Galleverabreichung 25 Röhrchen einer 24stünd. Agarkultur von lebenden Choleraerregern.

8 Kaninchen der 2. Versuchsreihe erhielten mit 7tägigen Zwischenpausen 2, 3 und 4mal subkutane Injektionen von durch Erhitzen abgetöteten Choleravibrionen in verschiedenen Mengen.

Die Versuchstiere der 1. Serie reagierten auf die Verabreichung der Galle und der lebenden Vibrionen mit starken Durchfällen. Der Durchfall hielt 2—3 Tage an. Die Temperatur sank bis 37,2. Nach 3—4 Tagen erfolgte Wiederherstellung. Am 7. Tage wurde die Agglutinationsfähigkeit des Blutes der immunisierten Kaninchen geprüft. Der Agglutinationstiter wurde nicht höher als 1 : 300 gefunden.

Die Kaninchen der 2. Serie reagierten selbst bei Einführung von 15 abgetöteten 24stünd. Kulturen (in 4 Malen) mit keinerlei Störung, außer mit einer ganz geringen Gewichtsabnahme. Der Agglutinationstiter erreichte in manchen Fällen Verdünnungen von 1:800.

Die Kaninchen der ersten und 2. Serie erhielten am 7. Tage nach Beendigung der Vakzinationsbehandlung 4 tödliche Dosen einer lebenden Cholerakultur.

Alle Kaninchen blieben am Leben, mit Ausnahme der zwei letzten, von denen das eine 2mal mit einer Dosis von $^1/_4$ und $^1/_2$ 24stünd. Kultur nach Kolle, das andere mit 25 Kulturen lebender Vibrionen nach Besredka behandelt waren.

Nach einer Sensibilisierung mit Galle wird offensichtlich das Choleravirus bei Verwendung lebender Kultur viel leichter aufgenommen; nicht allerdings bei Verwendung abgetöteter Vibrionen. Durch eine Vakzination per os mit lebenden Choleraerregern läßt sich bei Tieren eine ausgesprochene Immunität erzeugen. Der Grad der Immunität hängt voll und ganz von der Menge des durch den Organismus aufgenommenen Antigens ab. Um bei Anwendung der Besredka- oder Kolleschen Methode den gleichen Vakzinationseffekt zu erzielen, braucht man in ersterem Falle eine etwa 30mal größere Dosis, als es für eine subkutane Immunisierung nötig ist (25 Kulturen im ersten und $^3/_4$ Kultur im zweiten). Zieht man in Betracht, daß die Einheit eines lebenden Choleravirus im lebenden Organismus einen 10mal größeren Effekt als die Einheit eines abgetöteten Virus bewirkt (Pfeifferscher Versuch), so übertrifft die äquivalente Dosis im Besredka-Verfahren die in unseren Versuchen verwendete Vakzinationsdosis nach Kolle um etwa das 300fache. Die Notwendigkeit, eine große Menge Antigen zur Immunisierung per os zu verwenden, ist deshalb erklärlich, weil infolge der durch die Sensibilisierung hervorgerufenen Durchfälle ein großer Teil des Antigens aus dem Darm ausgestoßen wird. Bei einer Vakzination nach Kolle bleibt die Beteiligung des Darmes an der Bildung von Immunkörpern gegen die Infektion ungeklärt, aber es ist nicht zweifelhaft, daß die nach Kolle behandelten Kaninchen bei nachträglicher Infizierung mit lebenden Kulturen viel ausgesprochenere Darmerscheinungen zeigen als diejenigen Tiere, welche nach Besredka vorbehandelt sind. Im ersten Fall

ist die Annahme berechtigt, daß der Organismus den Kampf gegen die Infektion auf dem Wege einer Mobilisierung aller ihm zur Verfügung stehender Abwehrkräfte, darunter auch derer im Darm, aufnimmt. Bei einer Immunisierung nach Besredka beginnt dagegen dieser Kampf gegen die in den Organismus eingedrungenen Mikroben vor allen Dingen im Bereiche des Darmes. Die Choleraantikörper werden vor allem an der Stelle der örtlichen Einwirkung des Antigens gebildet. Erst später erscheinen sie auch in anderen benachbarten Geweben und Organen und im Blut. Diese Auffassung findet ihre Bestätigung in den Versuchen von Pfeiffer und Marx, welche bei gegen Cholera immunisierten Tieren 2 Tage nach der Immunisationsbehandlung das Vorhandensein von Lysinen, vor allem in der Milz, weniger im Knochenmark und in Spuren in den Lymphdrüsen und den Lungen nachwiesen, während sie im Blut um diese Zeit selbstverständlich noch nicht vorhanden waren. 7 Tage später war dagegen der Unterschied im Lysingehalt von Milz und Blut ausgeglichen — das Gleichgewicht zwischen Produktion der Antikörper und ihre Abgabe ins Blut war hergestellt.

Die vergleichende experimentelle Bewertung der Immunisierungsmethoden führt uns zu dem Schluß, daß die Verwendung des Besredka-Masaki-Verfahrens bei einer Immunisierung von Kaninchen gegen Cholera nur den einen Vorzug gegenüber der Kolleschen Methode besitzt, daß deutlichere örtliche Immunität zu Tage tritt. Der Hauptnachteil des Besredka-Verfahrens, der seine praktische Bedeutung erheblich beeinträchtigt, ist die Unmöglichkeit, bei einer Vakzination per os eine Immunität mit abgetöteten Kulturen zu erzielen. Eine Immunisierung mit lebenden Choleravibrionen am Menschen würde dagegen zweifellos niemand wagen. Wenn man ferner berücksichtigt, daß wir bei unseren Versuchen für ein Kaninchen von etwa über 1 kg Gewicht nicht weniger als 25 Röhrchen 24stünd. lebender Kultur verwendeten, um das Tier gegen eine Infektion mit 4facher tödlicher Dosis zu schützen, so würde für eine Immunisierung eines Menschen von mittlerem Gewicht (60—65 kg) eine unwahrscheinlich hohe Dosis von über anderthalb tausend lebender Kultur notwendig sein. Wir konnten ferner feststellen, daß die Menge von 5 ccm Galle zur Sensibilisierung des Darmes eines Kaninchens von etwa 1 Kilo Gewicht einen kaum merklichen Effekt hat, während Dosen von 10 ccm bei etwa gleichem Gewicht häufig den Tod des Versuchstieres bewirken. Wenn also 5 ccm auf 1 Kilo Körpergewicht des Tieres sich als unzureichend erweist, so müßte ein Mensch von mittlerem Gewicht bei einer Berechnung von 8 ccm Galle auf 1 Kilo Körpergewicht pfundweise Galle bekommen (480 bis 520 ccm), um den gewünschten Sensibilisierungseffekt zu erzielen. Zieht man ferner die stimulierende Wirkung der eingeführten Rindergalle auf die Produktionsapparate des gallebereitenden Apparates der Leber in Betracht (eine Schätzung des Ausmaßes dieses Prozesses ist äußerst schwierig), ferner des individuell verschiedenen Verhaltens des Darmes zur Galle, wie es in unseren Kaninchenversuchen zu beobachten war, und endlich die drohende Gefahr eines Eindringens von Darmerregern ins Blut, unter dem Einfluß der Sensibilisierung und als Folge dessen die Möglichkeit einer tödlichen Infektion, so muß

man anerkennen, daß dem Immunisierungsverfahren per os wenigstens in bezug auf Cholera eine praktische Bedeutung abgesprochen werden muß und seine breite Anwendung am Menschen nicht empfohlen werden kann.

Zusammenfassung.

1) Die Leiber der abgetöteten Choleravibrionen werden durch Kaninchen bei Einführung per os selbst in beliebigen Mengen nicht aufgenommen, unabhängig davon, ob die Kaninchen eine intakte Darmschleimhaut besitzen, oder ob diese infolge einer Sensibilisierung mit Galle geschädigt ist. — 2) Die zur Sensibilisierung verwendete Galle ruft erhebliche pathologisch-anatomische Veränderungen im Darme hervor. — 3) Die Schädigung des Darmes infolge der Sensibilisierung gestattet es den Bakterien des Darmes, zuweilen in den Organismus einzudringen und eine tödliche Allgemeininfektion hervorzurufen. — 4) Da es nicht möglich ist, die zur Erzielung eines genügenden Sensibilisierungseffektes erforderliche Galledosis zu berechnen, da der Intervall zwischen toxischer und unwirksamer Dosis zu gering ist, und man die individuelle verschiedene Reaktionsfähigkeit der Kaninchen auf Gallezufuhr in Betracht ziehen muß, kann die Anwendung der Galle als Sensibilisierungsmittel nicht empfohlen werden. — 5) Bei Einführung von abgetöteten Choleravibrionen per os nach Besredka gelingt es nicht, bei Kaninchen Immunität zu erzeugen. — 6) Der Choleraerreger ist zweifellos enterotrop und siedelt sich auch nach Einführung auf dem Blutwege im Darme an. — 7) Der im Darme angesiedelte Choleravibrio wirkt zerstörend auf das Epithel der Darmschleimhaut und erhöht gleichzeitig die Pathogenität der Darmsaprophyten (B. coli com.), wodurch für diese ein Eindringen ins Blut ermöglicht wird. Die Einführung von Galle per os unterstützt ihrerseits diesen Vorgang. — 8) Bei einer Immunisierung per os mit lebenden Choleraerregern gelingt es nach dem Besredka-Verfahren, bei sensibilisierten Kaninchen ausgesprochene Immunität zu erzeugen. Die Menge des bei diesem Immunisierungsverfahren durch den Organismus aufgenommenen Antigens zu berechnen, ist nicht möglich. — 9) Bei einer Immunisierung nach Kolle wird bei Kaninchen eine ebenso ausgesprochene Immunität gegen Cholera erzielt, wie bei Verwendung des Besredka-Masaki-Verfahrens. Die in ersterem Falle verwendete Dosis ist etwa 30mal geringer als die bei letzterem Verfahren erforderliche. — 10) Die Dosen der zur Darmsensibilisierung bei Vakzination per os für Menschen erforderlichen Galle, ebenso die Dosen des lebenden Choleraantigens, das an sich schon für Menschen nicht zu verwenden ist, müßten, wenn man bei der Berechnung von den im Kaninchenversuch gültigen Dosen ausgeht, kolossale Ziffern erreichen und dabei äußerst gefährlich werden. — 11) Auf Grund unserer Ausführungen glauben wir, daß die Immunisierungsmethode per os

gegen Cholera in der gegenwärtigen Form ihrer Anwendung keine praktische Bedeutung besitzt.

Zum Schluß ist es uns eine angenehme Pflicht, unserem hochverehrten Herrn Professor W. Barikin für die Ueberlassung des Themas und die Anleitung bei unseren Arbeiten unseren aufrichtigsten Dank auszusprechen.

Literatur.

A. Calmette, Ann. de l'Inst. Pasteur. 1923. p. 900. — A. Besredka, ibid. 1918. p. 199; 1919. p. 304, 557, 882. — L. Vaillant, ibid. 1922. p. 149. — Calmette et Guérin, ibid. 1907. p. 525; 1918. p. 689. — Cantacuzène et Marie, Compt. rend. Soc. de Biol. 1919. p. 842, 981. — G. Sanarelli, Ann. de l'Inst. Pasteur 1922. Nr. 5; 1923. Nr. 4; 1923. Nr. 9. p. 808. — Masaki, ibid. 1922. p. 400—415. — R. Pfeiffer, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 11, Bd. 18, Bd. 20. — Pfeiffer u. Marx, ibid. Bd. 27. 1898. S. 272. — Nicati et Rietsch, Rev. méd. 1885. — A. Tschitschkin, Der Darmtraktus in bakteriologischer Beziehung. [Dissert.] Moskau 1907. [russisch.] — Sabolotny u. Ssawtschenko, Centralbl. f. allgem. Pathol. Bd. 4. Nr. 16. — K. Shiga, Centralbl. f. Bakt. Abt. 1. Ref. Bd. 42. 1908. S. 419.

Untersuchungen über das Verhalten von Typhusbazillen im Kartoffelsalat.

[Aus dem Württembergischen Medizinischen Landesuntersuchungsamt (Vorstand: Ministerialrat Dr. von Scheurlen).]

Von Dr. **H. Mayser.**

Wenn Typhusepidemien auf Nahrungsmittel zurückgeführt werden, so kommen dabei als Infektionsquellen nur solche in Betracht, die in rohem Zustand genossen werden, oder solche, bei deren Zubereitung nach dem Kochen noch die Möglichkeit einer Infektion gegeben ist.

Unter diese letztere Gattung fällt der Kartoffelsalat, der schon mehrfach in ätiologischen Zusammenhang mit Typhusepidemien gebracht wurde (1). Es liegt jedoch in der Natur der Sache, daß bei all diesen Epidemien der einzig sichere Beweis, der Nachweis von Bazillen in dem betreffenden Salat, nie geführt werden konnte; infolge der Länge der Inkubationszeit ist nämlich, wenn erst einmal der Verdacht auf den Genuß eines bestimmten Nahrungsmittels fällt, von dem schuldigen Material längst nichts mehr vorhanden. Auch bei den vier seither in der Literatur beschriebenen Epidemien, die auf Kartoffelsalat zurückgeführt werden (1—4), ist nur ein indirekter Beweis dieser Aetiologie geführt; es waren in der Küche Typhusbazillenträger mit Kartoffelschälen beschäftigt, und eine Erkrankung trat nur bei den Personen auf, die den wahrscheinlich infizierten Salat genossen hatten, während andere verschont blieben. Ich halte diese Beweisführung für ausreichend und bin auf Grund eigener anderweitiger Erfahrung der Ueberzeugung, daß durch Kartoffelsalat Typhusepidemien insbesondere in Anstalten entstehen. Allein es erhebt sich sofort die bis jetzt noch ungeklärte und in keiner der vorstehend erwähnten Arbeiten erörterte Frage, genügt zur Entstehung der Epidemie die

von den Händen der Schälenden in den Salat übergegangene Bazillenmenge, denn es sind vermutliche Kartoffelsalatepidemien mit mehreren Hunderten von Erkrankungen beobachtet worden; oder ist anzunehmen, daß sich die Typhusbazillen durch zufällig besondere Behandlung der gekochten, geschälten und gerädelten Kartoffeln oder sogar des fertig bereiteten Salats rasch zu vermehren imstande sind. Zur Klärung dieser Fragen habe ich die im folgenden beschriebenen Untersuchungen angestellt.

Zunächst wurden die Wachstumsverhältnisse in der in Betracht kommenden kurzen Zeit auf den gekochten, in Scheiben geschnittenen Kartoffeln geprüft, da beim Stehen in diesem Zustand eine Vermehrung der Bazillen denkbar wäre, hernach Versuche mit bereitetem Kartoffelsalat angestellt. Zur Prüfung des Wachstums des Typhusbazillus auf gekochten Kartoffeln wurden die unverletzten rohen Kartoffeln gründlich gewaschen und gebürstet, geschält und mit frischem Messer in Scheiben geschnitten, die dann in Petrischalen gelegt wurden. Darin wurden sie 45—60 Min. im Autoklaven sterilisiert und dann mit 24stünd. Agarkultur strich- oder punktförmig mit der Oese beimpft. Ich konnte, was auch in der Literatur bekannt ist (5), eine ganz geringe flächenhafte Ausdehnung der Impfstriche oder -punkte nach 24 bis 48 Std. feststellen. Der Nachweis der Ausdehnung wurde, da das Wachstum des Typhusbazillus auf der Kartoffel in schlecht wahrnehmbaren Kolonien stattfindet, mittels Abimpfung auf Drigalsky-Platten und mittels des gefärbten Präparates geführt. Eine Ausdehnung der Kolonien weiter als auf $^1/_2$ cm Entfernung konnte nie nachgewiesen werden, auch brauchten sie hierzu wenigstens 24 Std. Mit Hilfe der Abimpfung und des mikroskopischen Präparates konnte für ein nennenswertes Wachstum in die Tiefe kein sicherer Nachweis erbracht werden.

Eine weitergehende Prüfung des Wachstums hinsichtlich der Flächen- und Tiefenausdehnung der Typhuskolonien schien durch eine Färbung der Kartoffeln möglich zu sein. Nach den Untersuchungen von Rothberger (6—7) werden sehr viele von den gebräuchlichsten Farbstoffen durch das Reduktionsvermögen der Bakterien entfärbt, so z. B. Toluidinblau, Safranin, Methylenblau. Weiterhin hat Fr. Müller (8—9) speziell die reduzierenden Eigenschaften des Typhusbazillus untersucht und dabei gefunden, daß Methylenblau sich für diese Reduktionsversuche des Typhusbazillus am besten eignet. Ich bin bei einer Nachprüfung seiner Versuche zu dem gleichen Ergebnis gekommen. Es wurde daher in den folgenden Färbeversuchen von Kartoffeln ebenfalls Methylenblau verwandt. Andererseits war beim Wachstum auf gefärbten Nährböden auch eine stärkere Färbung der Kolonien zu erwarten, da die bereits abgestorbenen Individuen der Kultur den Farbstoff aus der Umgebung aufnehmen und die Kolonien so stärker gefärbt erscheinen. Diese „Kondensation“ ist von Eisenberg, Buchner, Birch-Hirschfeld, Nakanishi (10) bereits beschrieben. Am besten gelang die Vorbereitung und Färbung folgendermaßen: Nach Abwaschen und Abbürsten wurden die Kartoffeln in rohem Zustand geschält und mit frischem Messer in ca. 2—3 mm dicke Scheiben geschnitten, die in Petri-Schalen gelegt wurden. Diese wurden 45 Min. lang im Autoklaven sterilisiert und hernach mit einer vorher durch Kochen keimfrei gemachten Methylenblaulösung 1:20000 bis zur vollständigen Bedeckung der Kartoffelscheiben gefüllt, die dann nach 24 Std. abgeschüttet wurde. So waren die Kartoffelscheiben immer ganz

gleichmäßig gefärbt. Wurde, was nahelag, die Kartoffelscheibe in der Petri-Schale zusammen mit der Methylenblaulösung gekocht, so trat eine Entfärbung ein; ich führe dies auf Reduktion des Methylenblau durch das Kochen mit organischer Substanz zurück. Die Impfung der so vorbereiteten Kartoffeln geschah wie bei der vorhergehenden Versuchsreihe mit 24stünd. Typhusagarkulturen. Nach 24 Std. erschien der Impfstrich besonders an der Stelle, wo die aufgetragene Bakterienmasse am dicksten war, immer dunkler als die Kartoffel. Eine Entfärbung in der Nähe der Kolonien konnte nie festgestellt werden. Es wurde also die Entfärbung durch Reduktion von der stärkeren Färbung durch die oben erwähnte „Kondensation" übertroffen, was ja auch bei der geringen chemischen Aktivität des Typhusbazillus und der großen Verdünnung der Methylenblaulösung zu erwarten war. Im hängenden Tropfen und im Trockenpräparat fanden sich viele gefärbte Stäbchen. Das Vorkommen von Stäbchen mit gefärbten Enden führe ich auf Plasmolyse zurück. Durch Eintritt des Farbstoffes wird die Bakterienzelle so schwer geschädigt, daß ihr Protoplasma zusammenschrumpft, sich an den Enden ansammelt, und dort gefärbt wird. Die so gefärbten Individuen waren dann auch nicht mehr beweglich, während solche, die noch Beweglichkeit zeigten, keine Färbung aufwiesen. Daß die Schädigung durch den Farbstoff jedoch keine so weitgehende war, daß diese Methode für den gewünschten Zweck nicht brauchbar wäre, zeigt die Tatsache, daß auf den meisten Kartoffeln eine Ausdehnung der Kolonien nach der Fläche durch eine dunklere Färbung sichtbar wurde; und zwar betrug dieselbe bei dieser Versuchsreihe gerade so, wie bei der ungefärbten Kartoffel, höchstens $^1/_2$ cm. Das Vorhandensein von Bakterien in dieser Zone stellte ich durch mikroskopische Ausstrichpräparate fest, während außerhalb der dunkler gefärbten Stellen mikroskopisch und kulturell keine Typhusbazillen nachzuweisen waren. Die Färbung in dieser Ausbreitungszone beruht also auf der Anwesenheit von Bakterien. Vom 3.—7. Tag nach der Impfung wurde die Ausbreitung auf den gefärbten Kartoffeln sichtbar, jedoch läßt sich über die Schnelligkeit der Ausdehnung aus diesen Versuchen kein genauer Schluß ziehen, da nach dem oben Gesagten die Bakterien erst nach dem Absterben eine Färbung annehmen. Ein Wachstum der Typhusbazillen in die Tiefe der Kartoffeln oder durch die dünnen Scheiben hindurch, das sich hier durch die dunklere Färbung auf dem Durchschnitt hätte kundtun müssen, war in keinem Falle angedeutet.

Wenn durch Wachstum auf mit Methylenblau gefärbten Kartoffeln das Vorhandensein von Bakterien erst nach dem Absterben derselben sichtbar wurde, so sollte durch folgende Versuche eine Sichtbarmachung der Bakterien durch einen Lebensvorgang ermöglicht werden. Von Scheurlen (11) wurden die Salze der selenigen und tellurigen Säure in die Bakteriologie eingeführt, und durch Klett (12) ihre Verwendbarkeit zur Demonstration der reduzierenden Eigenschaften der Bakterien geprüft. Aus den farblosen Lösungen des Natrium- und Kaliumsalzes der selenigen und tellurigen Säure wird durch die Reduktionskraft der Bakterien metallisches rotes Selen bzw. schwarzes Tellur ausgeschieden. Eine Beeinträchtigung der Fortpflanzungsfähigkeit und der Virulenz findet nach Klett bei den gebräuchlichen Verdünnungen nicht statt, Gosio (13), der Selen- und Tellursalze zum Nachweis von Bakterienleben in Impfstoffen benützte, ist wie Klett der Ansicht,

daß die Reduktion der Salze zu metallischem Selen und Tellur nur vom lebenden Individuum besorgt wird. Ich verwandte zu meinen Versuchen das weiße, kristallinische Natrium selenosum purissimum Merck und das ebenfalls weiße Kalium tellurosum purissimum Merck. Die Imprägnierung der Kartoffeln wurde in ähnlicher Weise vorgenommen, wie die Färbung mit Methylenblau; und zwar wurde die fertig sterilisierte dünne Kartoffelscheibe in der Petri-Schale für 24 Std. mit steriler Natrium selenosum- bzw. Kalium tellurosum-Lösung 1 : 10000 übergossen. Ein Kochen der Lösungen mit der Kartoffel war hier ebenfalls nicht angängig, da dabei die selenige bzw. tellurige Säure reduziert wird, was sich durch Rot- bzw. Schwarzfärbung kundtut. Das Aussehen der Kartoffeln war nach dem Abgießen der Flüssigkeit unverändert, und auch bei wochenlangem sterilen Aufbewahren trat keine Färbung ein. Nach Beimpfen der so imprägnierten Stücke mit Abstrichen von 24stünd. Typhusagarkulturen trat nach 24 bis spätestens 36 Std. eine Färbung der beimpften Stelle ein. Eine geringe Ausbreitung, die sich hier am 1.—5. Tage nach der Impfung zeigte, also doch etwas früher als bei den Methylenblauversuchen, konnte bis höchstens 1 cm weit wahrgenommen werden. Außerhalb der gefärbten Stellen waren mikroskopisch und kulturell nie Bakterien aufzufinden. Ein Wachstum in die Kartoffel hinein, was beim Durchschneiden geprüft wurde, konnte nie gesehen werden. Es war auch bei den Selen- und Tellurversuchen zu konstatieren, daß eine Färbung zuerst an der Stelle der dicksten Bakterienmasse auftrat. Bei Impfungen mit einem Tropfen einer 24stünd. Bouillonkultur war die chemische Aktion der Bakterien nicht stark genug, um eine sichtbare Färbung hervorzurufen; es bildeten sich vielmehr nur an wenigen Stellen innerhalb des Bereichs des Tropfens ganz kleine gefärbte Punkte. Was die Verwendbarkeit der beiden Salze Natrium selenosum und Kalium tellurosum betrifft, so ist für diesen Zweck dem Natrium selenosum der Vorzug zu geben, da die rote Farbe auf der Kartoffel mehr auffällt. Außerdem schien das Wachstum bei Verwendung von Kalium tellurosum im Vergleich zum Natrium selenosum bei gleicher Konzentration gehemmt; wandte man eine geringere Konzentration an, so trat keine Färbung mehr ein. Eine starke Vermehrung durch selbsttätige Ausbreitung der Typhusbazillen über die Kartoffeln in kurzer Zeit kommt, wie die beschriebenen Versuche übereinstimmend ergaben, nicht in Frage.

Wenn der Kartoffelsalat eine besondere epidemiologische Bedeutung hat, so müssen demnach von den Händen des bazillentragenden Kartoffelschälers, beträchtliche Mengen Bazillen in den Salat gelangen, wie dies auch Drigalsky in seinen Ausführungen über Typhusübertragung in der Denkschrift über Typhusbekämpfung für wahrscheinlich hält (14), und die Verteilung der Bazillen über den ganzen Salat muß von dem Durchmischen bei der Bereitung herrühren. Bei dieser Erklärungsweise ist zuerst auszuschließen, daß die zur Bereitung des Salates verwandten Zutaten, wie Essig und Oel, bakterizide Kraft haben. Unverdünnter Essig tötet nach verschiedenen Untersuchungen von Crescenzi (15), Bindseil (16), Stockvis (17) Typhusbakterien ab, jedoch bei Verdünnungen, wie sie in der Küche gebraucht werden, kommt eine bakterizide Wirkung nicht mehr in Frage. Ich habe diese Angaben nachgeprüft, indem ich zuerst die als Essig benutzten Essigsäureverdünnungen mit Typhusbazillen beimpfte (3 große

Oesen einer Typhusagarkulturabschwemmung auf 4 ccm Essigsäureverdünnung) und davon nach bestimmter Zeit auf Drigalsky-Agar abimpfte. In den folgenden Tabellen, in denen die +-Zeichen Vorhandensein von fortpflanzungsfähigen Bakterien, —-Zeichen Unmöglichkeit der Weiterzüchtung bedeuten, sind die Ergebnisse festgelegt:

Essigsäurekonzentrationen	12proz.	10proz.	8proz.	6proz.	4proz.	3proz.	2proz.	1proz.
Einwirkungszeit:								
10 Min.	—	—	—	—	—	+	+	+
15 „	—	—	—	—	—	+	+	+
30 „	—	—	—	—	—	+	+	+
60 „	—	—	—	—	—	—	+	+
120 „	—	—	—	—	—	—	—	—

Da bekannt ist, daß eine Abtötung von Bakterien in Desinfektionsflüssigkeiten mit Kochsalzgehalt früher erfolgt, als in rein wässeriger Lösung, stellte ich folgende Versuche mit destilliertem Wasser und mit physiologischer Kochsalzlösung, die im Geschmack etwa den mildesten Ansprüchen genügt, als Verdünnungsmittel der Essigsäure an:

Essigsäureverdünnung mit destill. Wasser	1proz.	0,5proz.	0,25proz.
Einwirkungszeit:			
1 Std.	+	+	+
2 „	—	+	+
3 „	—	+	+
4 „	—	—	+
5 „	—	—	—

Essigsäureverdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung	1proz.	0,5proz.	0.25proz.
Einwirkungszeit:			
1 Std.	—	+	+
2 „	—	—	+
3 „	—	—	—

Der geringe Kochsalzgehalt von 0,85 Proz. hat demnach schon die Dauer der Abtötungszeit in den 0,25proz. Lösungen von 4 auf 2 Std. abgekürzt. Ich setzte bei weiteren Versuchen der Essigsäurekochsalzlösung noch zerdrückte Kartoffeln im ungefähren Verhältnis von 8:1 zu. Das Ergebnis war folgendes:

Essigsäureverdünnungen mit physiol. Kochsalzlösung und Kartoffeln	1proz.	0,25proz.
Einwirkungszeit:		
1 Std.	+	+
8 „	+	+
9 „	—	+
24 „	—	+
30 „	—	+

Sonach hat die Essigsäure eine schwach bakterientötende Wirkung, die aber durch die Anwesenheit von Kartoffel völlig aufgehoben wird; denn es waren bei Essigsäureverdünnungen, wie sie für die Salat-

zubereitung verwandt werden, mit Kochsalzzusatz und bei Anwesenheit von Kartoffeln noch nach 30 Std. lebensfähige Typhusbazillen vorhanden. Die bakterizide Wirkung des Essigs wird also, wenn eine solche noch in den gebräuchlichen Verdünnungen vorhanden ist, durch die Kartoffeln aufgehoben.

Sodann untersuchte ich das Wachstum von Typhusbazillen im fertig bereiteten Kartoffelsalat, den ich jedesmal frisch aus 200—250 g gekochten Kartoffeln, Essig, Oel, Fleischbrühe und Kochsalz herstellte. Eine Scheibe der gekochten und geschälten Kartoffeln wurde, wie nachher beschrieben, infiziert und zu der übrigen Masse gebracht, Essig, Oel und Fleischbrühe darüber gegossen und kräftig durchgemischt. Der Salat wurde dann bei 37° in den Brutschrank gestellt. Stündlich wurde von den verschiedensten Stellen sowohl auf Drigalsky-Agar mit einer Oese abgeimpft, als auch ein kleines Stück Kartoffel in ein Bouillon- und Galleröhrchen gebracht und 24 Std. bebrütet. Die ersten Versuche wurden mit Reinkulturen von Typhusbazillen gemacht. Wurde dabei weniger als $^1/_{1000}$ Oese zur Infektion benützt, so konnte ich Typhusbazillen nie finden; bei $^1/_{1000}$ Oese und mehr fand ich nach 1 Std. mit der Untersuchung beginnend bis zu 24 Std. stets reichlich Bazillen in dem direkten Ausstrich auf Drigalsky-Agar und nach Anreicherung in Bouillon und Galle.

Bei weiteren Versuchen wurde mit Typhusstuhlaufschwemmung gearbeitet. Diese war so beschaffen, daß auf 5 ccm Aufschwemmung, die aus einer haselnußgroßen Stuhlprobe und ca. 20 ccm Wasser hergestellt wurde, 3 Oesen 24stünd. Typhuskultur kamen. Es wurde davon mit steigenden Mengen (1—10 Oesen) immer nur ein Stückchen Kartoffel infiziert und dieses dann in den Salat gemischt. Der Nachweis geschah auch hier wieder durch direkten Abstrich auf Drigalsky-Agar nach verschieden langem Stehenlassen bei 37°. Nur wenn der Salat mit 3 und mehr Oesen Stuhlaufschwemmung beimpft war, konnten aus dem direkten Abstrich Typhusbazillen nachgewiesen werden. Von einer Anreicherung in Bouillon oder Galle wurde diesmal wegen der Begleitbakterien abgesehen. Beträchtliches Wachstum im Salat kommt auch bei diesen Versuchen nicht in Frage, sonst hätten bei Impfung von kleineren Bakterienmengen (1 und 2 Oesen) wenigstens nach einiger Zeit Bakterien nachgewiesen werden müssen; ebensowenig ist auch nach vielen Stunden eine Abtötung erfolgt.

Es erhob sich aber die praktische Frage, ob von den Händen so viel Typhusbakterien in den Salat gelangen können, daß sie durch die angeführten Methoden nachgewiesen werden können. Ich führte deswegen weitere Versuche, die zugleich den Einfluß einer oberflächlichen Händewaschung zeigen, in folgender Anordnung aus: einmal infizierte ich meine Hände mit Abschwemmungen von Typhusbazillenagarkulturen, ließ dieselben etwas antrocknen und schälte dann Kartoffeln, die ich in der beschriebenen Weise zu Salat verarbeitete. Später stellte ich denselben Versuch mit der Abänderung an, daß ich vor dem Schälen der Kartoffeln meine Hände mit Wasser in der üblichen Weise des Händewaschens, aber ohne Seife, abspülte. Eine vergleichende Gegenüberstellung beider Versuche gibt folgende Tabelle:

Nach	1	2	3	6	8	10	22 Std.
ohne Händewaschung	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞
mit Händewaschung	+	+	+	0	0	0	0

In dem Versuch ohne Händewaschen war die Zahl der nachgewiesenen Bazillen im direkten Ausstrich immer sehr groß; im Versuch mit Händewaschen dagegen waren in den ersten 3 Std. jedesmal nur vereinzelte Kolonien aufgegangen, während später auch durch die Anreicherungsmethode in Bouillon und Galle keine Typhusbazillen mehr nachzuweisen waren. Eine Erklärung für das Verschwinden der Typhusbazillen nach 3 Std. möchte ich nicht wagen; hierzu müßten weitere Versuche angestellt werden. Jedenfalls steht fest, daß die Zahl der Bakterien durch die Händewaschung ganz beträchtlich vermindert wurde.

Es ergibt sich aus diesen Versuchen der wichtige Schluß für die Praxis, daß beim Küchenpersonal und auch bei den zur Unterstützung desselben herangezogenen Hilfskräften auf eine gründliche Händewaschung mit Seife und Bürste, womöglich unter fließendem Wasser, vor jedesmaliger Inangriffnahme der Arbeit und auch nach jedesmaliger Benützung des Abortes geachtet werden muß. Diese dem gebildeten Menschen selbstverständlich erscheinenden Maßnahmen zu fordern, ist um so berechtigter, wenn man bedenkt, daß z. B. in Heilanstalten oft alte Kranke zu dieser Arbeit verwendet werden, von denen der Sinn für Reinlichkeit nicht immer vorausgesetzt werden kann. Auch ist zu bedenken, daß unsere Untersuchungsmethoden auf Typhusbazillenträger uns nicht selten im Stich lassen, so daß die Ausmerzung gefährlicher Elemente nicht immer gelingt.

Zusammenfassung.

1) Die Beschuldigung des Kartoffelsalates als Vermittler von Typhusepidemien in Anstalten usw. erscheint auf Grund praktischer Beobachtungen begründet. — 2) Die Infektion des Salates kommt vermutlich ausschließlich beim Schälen und Zerschneiden der gekochten Kartoffeln durch Bazillenträger zustande. Da Epidemien mit mehreren Hunderten von Erkrankungen auf Genuß infizierten Kartoffelsalates schon zurückgeführt wurden, erhebt sich die Frage, ob Typhusbazillen sich im Kartoffelsalat vermehren. — 3) Die vorgenommenen Untersuchungen haben ergeben, daß das Wachstum von Typhusbazillen auf frischen, geschälten Kartoffeln so langsam vor sich geht, daß eine erhebliche Vermehrung in wenigen Stunden, wie sie bei dem üblichen Verfahren der Speisenbereitung in Anstalten in Betracht kommen könnte, nicht anzunehmen ist. — 4) Schon 4proz. Essig tötet Typhusbazillen in wenigen Minuten ab. Die bakterientötende Wirkung wird durch Kochsalzzusatz verstärkt, sie wird aber durch die Kartoffel völlig aufgehoben. Typhusbazillen werden in fertig bereitetem Kartoffelsalat nicht abgetötet. — 5) Demnach ist anzunehmen, daß die von den unreinen Händen des Kartoffelschälenden an den Kartoffeln hängenbleibenden Typhusbazillen ohne weitere Vermehrung durch Wachstum in diesen die Epidemien hervorrufen. Die Versuche haben aber gezeigt, daß ein einfaches Waschen die Zahl der Typhusbazillen an den Händen so vermindert, daß sie im Salat kaum mehr nachweisbar sind. — 6) Die praktische Folgerung aus vorstehenden Versuchen geht dahin,

daß zwar erkannte Typhusbazillenträger selbstverständlich von der Arbeit des Kartoffelschälens auszuschließen sind, daß aber, um auch die Gefahr der unerkannten zu verringern, auf eine gründliche vorherige Händereinigung bei allen an dieser Arbeit Beteiligten zu achten ist, wodurch jedenfalls die Gefahr einer großen Epidemie ausgeschlossen werden dürfte, wenn auch einzelne Erkrankungen hierdurch nicht immer ganz zu vermeiden sein werden. — 7) In jedem Gemüseputzraum sollte ein weithin sichtbarer Anschlag, der diese Reinlichkeitsforderung enthält, angebracht werden.

Literatur.

1) Uhlenhuth, in Friedberger-Pfeiffer, Bd. 2. S. 587. Jena, Fischer. — 2) Solbrig, Klin. Jahrb. Bd. 1. 1909. — 3) Schmiz u. Keßler, Münch. med. Woch. 1913. S. 1324. — 4) Schmiedicke, Veröff. a. d. Geb. d. Mil.-San.-Wes. 1919. H. 63. — 5) Lösener, Arb. Kais. Ges.-A. Bd. 11. S. 213. — 6) Rothberger, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 24. S. 513. — 7) Ders., ebenda. Abt. I. Orig. Bd. 25. S. 15. — 8) Müller, Fr., ebenda. Abt. I. Orig. Bd. 26. S. 51. — 9) Ders., ebenda. Abt. I. Orig. Bd. 26. S. 801. — 10) Eisenberg, ebenda. Abt. I. Orig. Bd. 71. S. 420. — 11) Scheurlen, Ztschr. f. Hyg. Bd. 33. S. 135. — 12) Klett, ebenda. Bd. 33. S. 137. — 13) Gosio, ebenda. Bd. 51. S. 65. — 14) Drigalsky, Arb. Kais. Ges.-A. Bd. 41. S. 228. — 15) Crescenzi, ref. Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 40. S. 770. — 16) Bindseil, Ztschr. f. Hyg. Bd. 84. S. 181. — 17) Stockvis, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 48. S. 436.

Zur Frage des Nachweises von Tuberkelbazillen im Auswurf.

[Aus dem Bakteriologischen Institut zu Smolensk (Direktor: M. Isabolinsky).]

Von **M. Isabolinsky** und **W. Gitowitsch.**

Die alte Ziehl-Neelsensche Methode, die zur Färbung von Tuberkelbazillen und zu ihrer Differenzierung von anderen pathogenen, in den pathologischen Produkten des menschlichen Organismus sich findenden Mikroorganismen dient, hat sich seit mehr als 25 Jahren in der Laboratoriumspraxis bewährt. Trotz ihrer allgemeinen Anerkennung und ihrer großen Verdienste in der Tuberkulosediagnostik besteht seit längerer Zeit das Bestreben, diese alte Methode durch neue Färbungsmethoden zu ersetzen. Begründet ist dies dadurch, daß in manchen Fällen von klinisch einwandfreier Tuberkulose die Ziehl-Neelsen-Färbung trotz mehrfacher Untersuchung des Sputums keine befriedigenden Resultate liefert. Es verdient daher jede neue Methode, die uns die Möglichkeit gibt, mikroskopisch die Tuberkulosediagnose zu stellen, unsere Aufmerksamkeit.

1913 haben M. Isabolinsky und R. Schwerina an einer großen Anzahl von Sputa 14 verschiedene Färbungsmethoden geprüft. Sie kamen auf Grund dieser Untersuchungen, die etwa 800 Präparate umfaßten, zu dem Schlusse, daß die besten Resultate doch die alte Ziehl-Neelsensche Methode gibt, ihr nahe kamen die Methoden von Hermann und Spengler; alle anderen Färbungsmethoden leisteten wesentlich weniger als die Ziehlsche. Eine besondere Beurteilung beanspruchte die Methode von Much, die zur Färbung der körnigen Formen der Tuberkelbazillen dient. Da die Natur dieser Körnchen damals noch nicht genügend

aufgeklärt war, so wurde kein entscheidendes Urteil über diese interessante und wesentliche Erscheinung abgegeben.

Während der letzten 10 Jahre sind viele neue Färbemethoden für Tuberkelbazillen im Sputum vorgeschlagen worden, von denen die von Kronberger, Konrich, Much-Weiß und Semenoff an einem größeren Material von uns kontrolliert worden sind. Zum Vergleich wurden daneben stets die Ausstriche nach Ziehl-Neelsen gefärbt, wobei die Präparate nicht, wie gewöhnlich bis zum Kochen, sondern zur zwei- oder dreimaligen Dampfbildung erwärmt wurden.

I. Methode nach Kronberger.

Die Ausstrichpräparate mit dem aufgegossenen Karbolfuchsin werden bis zur Dampfbildung erwärmt, dann durch 15proz. Salpetersäure entfärbt, mit 60proz. Alkohol während einiger Sekunden gewaschen und zur Kontrastfärbung mit Tinct. jodi offic., die mit 4 Teilen 60proz. Alkohol vermischt wird, beschickt.

Auf dem gelben, wenig ausgeprägten, Untergrunde sieht man dunkelviolette, z. T. körnige (jodophile Körnung), z. T. schlecht gefärbte Tuberkelbazillen. Oft kommen Bildungen vor, die Tuberkelbazillen vortäuschen können, tatsächlich handelt es sich aber um Artefakte, die hauptsächlich durch Jod hervorgerufen werden. Die Bazillenmenge ist in der Mehrzahl der Fälle viel geringer als in Präparaten, die nach Ziehl-Neelsen gefärbt sind. In 3 Fällen, in welchen wir nach Ziehl-Neelsen 5—6 Tuberkelbazillen im Präparate nachgewiesen haben, war das Ergebnis nach Kronberger trotz mühsamer und mehrfacher Durchmusterung der gefärbten Ausstrichpräparate negativ.

II. Methode nach Konrich.

Die Präparate werden mit heißem (aber nicht kochendem) Karbolfuchsin 1—2 Min. lang gefärbt, dann durch 10proz. Natr. sulfuros. bis zum Verschwinden des Rosatons der Fuchsinfarbe entfärbt, unter der Wasserleitung abgespült und mit gesättigter, wässeriger Malachitgrünlösung (50 Teile Malachitgrün + 100 Teile Wasser) während $^1/_2$ Min. nachgefärbt.

Auf grünem Grunde sieht man gut gefärbte rote Tuberkelbazillen. Die Präparate sind sehr rein, ohne Niederschläge, leicht zu durchmustern. Diese Methode hat aber ihren Fehler darin, daß man jeden 2. oder 3. Tag eine frische Lösung von Natr. sulfuros. herstellen muß, um gute Präparate zu erzielen. Die nach Konrich gefärbten Präparate können nicht lange aufbewahrt werden, da sie sich leicht entfärben. v. Bergen schlägt deshalb eine kombinierte Behandlung der Präparate mit Sulfitlösung und 60proz. Alkohol vor, wodurch er bessere Resultate erzielte. In Fällen, in denen wir nach Ziehl-Neelsen keine Bazillen fanden, waren sie auch nach der Konrichschen Methode nicht nachweisbar.

III. Methode nach Semenoff.

Das Ausstrichpräparat wird mit 8—10 Tropfen einer Farblösung gefärbt, die aus 5 ccm 10proz. filtrierter alkoholischer Dahlialösung und 100 ccm $^1/_2$proz. Karbolwasser besteht, dann erfolgt Wasserspülung und Entfärbung mittels 10proz. Schwefelsäurelösung in 70proz. Alkohol bis zum sichtbaren Verschwinden der violetten Farbe des Präparates, hierauf Wasserspülung und Kontrastfärbung mittels $^1/_2$proz. wässeriger Aurantialösung, endlich abspülen mit Wasser, abtrocknen und mikroskopische Untersuchung.

Auf dem gelben von Niederschlägen freien Gesichtsfelde sieht man bei dieser Färbemethode scharf ausgeprägte dunkelviolette Tuberkelbazillen. Im Gegensatz zu Semenoff konnten wir körnige Einschlüsse nur selten beobachten. In einigen Fällen war die Bazillenzahl etwas größer als in Präparaten, die nach Ziehl-Neelsen gefärbt waren; für rein praktische Zwecke hat aber dieser Umstand keine wesentliche Bedeutung. Wichtig ist die Tatsache, daß wir in denjenigen Fällen, in denen wir keine Tuberkelbazillen in nach Ziehl-Neelsen gefärbten Präparaten fanden, dieselben auch in den nach Semenoff gefärbten Präparaten nicht nachweisen konnten. Da außerdem die Farbstoffe Dahlia und Aurantia in Rußland schwerer zu erhalten sind als Fuchsin und Methylenblau, so scheint uns diese neue Färbemethode keine Vorzüge vor der alten Methode nach Ziehl-Neelsen zu besitzen.

IV. Methode nach Much-Weiß.

Man läßt das Präparat 24 Std. in frisch vorbereitetem und filtriertem Gemische, das aus 3 Teilen Karbollösung und 1 Teil Methylviolettlösung (10 ccm gesättigter alkoholischer Methylviolettlösung + 90 ccm 2proz. Karbolsäurelösung) stehen. Am folgenden Tage wird das Präparat 10 Min. lang mittels Lugollösung gefärbt, dann während 1 Min. mit 5proz. Salpetersäure, 10 Sek. mit Salzsäure und endlich mit Acetonalkohol bis zur Entfärbung behandelt.

Auf dem lilablauen Grunde sieht man schöne dunkelviolette körnige Formen der Tuberkelbazillen. In einigen Fällen kann man die Zahl der Körnchen, aus denen der Tuberkelbazillus zusammengesetzt ist — etwa 6—8 — zählen; gleichzeitig kann man auch einzelne Körnchengruppen beobachten. Diese Färbemethode ist unersetzlich in denjenigen Fällen, in denen nach Ziehl-Neelsen färbbare Tuberkelbazillen sich nicht finden und nur die Muchschen Granula vorhanden sind, deren Natur heutzutage schon genügend aufgeklärt ist. In diesem Sinne besitzt die Much-Weißsche Färbemethode eine große diagnostische Bedeutung und steht höher als alle anderen, auch als die Ziehl-Neelsensche.

Ein Vergleich der zuvor angeführten Färbemethoden zeigt uns, daß keine von diesen Methoden irgendwelche Vorzüge vor der alten klassischen nach Ziehl-Neelsen besitzt, vorausgesetzt, daß bei letzterer das Karbolfuchsin nicht aufgekocht, sondern bis zur Dampfbildung erwärmt wird. Das Kochen kann wenig widerstandsfähige Tuberkelbazillen zerstören und damit zu Irrtümern führen in denjenigen Fällen, in denen derartige Bazillen in den Sputa in überwiegender Mehrzahl vorhanden sind.

Bei der Untersuchung der Sputa legen wir besonderen Wert auf die Auswahl der Sputumteile. Es unterliegt keinem Zweifel, daß die makroskopischen Eigenschaften der Sputa bei verschiedenen Erkrankungen der Atmungsorgane verschieden eigentümliche Eigenschaften besitzen, die ein erfahrener Forscher schon am äußeren Aussehen des Sputums erkennt und die in vielen Fällen Anweisungen geben können, in welcher Richtung die Untersuchung fortzuführen ist.

Nach unseren Beobachtungen liefert keine der oben angeführten Methoden bessere Resultate als die Ziehl-Neelsensche. Eine Sonderstellung nimmt die Much-Weißsche Methode ein, die eine große Bedeutung für die Tuberkulosediagnostik besitzt, da sie diejenigen Formen des Tuberkulosevirus zu entdecken gestattet, die wegen ihrer

chemischen Eigenschaften mit der Ziehl-Neelsenschen Methode sich nicht nachweisen lassen.

Zur Homogenisierung des Sputums benutzten wir die alte Antiforminmethode nach Uhlenhuth und die von Ellermann-Erlandsen angegebene Methode. Die ursprüngliche Methode Uhlenhuths hat bekanntlich verschiedene Modifikationen erfahren (Lorenz, Loeffler, Brecke u. a.). Am meisten verbreitet ist jetzt die Modifikation von Lorenz, nach der man das Sputum mit 2—3 Volumenteilen einer 15proz. Antiforminlösung vermischt und bis zum Kochen erwärmt. Lubarsky hat in letzter Zeit mit dieser Methode recht günstige Resultate erzielt und gibt ihr den Vorzug vor allen anderen Methoden. Ohne Zweifel leistet uns die Antiforminmethode große Dienste in denjenigen Fällen, in denen wir auf gewöhnlichem Wege keine Tuberkelbazillen entdecken können. Andererseits ist aber zu berücksichtigen, daß gleichzeitig mit standhaften Tuberkelbazillen in dem Auswurf auch ganz feine und zarte Bazillen vorhanden sind, die durch das Antiformin namentlich in höheren Konzentrationen zerstört werden können. Auf diese Erscheinung hat einer von uns (Isabolinsky) bereits 1911 hingewiesen. Lubarsky hat alle Stadien der Lipolyse der Tuberkelbazillen unter der Einwirkung von hohen Antiforminkonzentrationen beobachtet, vom teilweisen bis zum vollständigen Verlust ihrer säurefesten und jodophilen Eigenschaften. Es ist in diesem Sinne sehr interessant, die experimentelle Arbeit von Bergel, der den Bakteriolyseprozeß in der Bauchhöhle der Maus verfolgt hat. Wenn man von diesen negativen Eigenschaften hoher Antiforminkonzentrationen absieht, so muß doch anerkannt werden, daß die 15proz. Antiforminlösung in vielen Fällen in der Tuberkulosediagnostik sich bewährt hat. Auf Grund unserer Untersuchungen können wir sagen, daß nach der Bearbeitung der Sputa mit Antiformin ein Kochen derselben überflüssig und sogar schädlich ist, da dadurch die labilen Bazillenformen leicht zerstört werden können. Unsere vergleichenden Untersuchungen mit und ohne Aufkochen erwiesen uns, daß ohne Kochen viel günstigere Resultate erzielt werden können, namentlich war die Zahl der Tuberkelbazillen viel größer, wenn nicht aufgekocht wurde. Bei der Bearbeitung der Sputa mit 15proz. Antiformin muß die Einwirkung desselben mindestens 24 Std. dauern, um eine völlige Homogenisierung der Präparate zu erzielen. Bei solcher Bearbeitung konnten wir in 7 von 30 Sputa, in denen mit den gewöhnlichen Färbungsmethoden keine Tuberkelbazillen auffindbar waren, noch je 8—10 Bazillen nachweisen.

Die Methode nach Ellermann-Erlandsen besteht darin, daß 10—15 ccm Sputum mit der halben Menge 0,6proz. kohlensaurer Natronlösung zusammengemischt und während 24 Std. bei 37 ^{0} in den Thermostat gestellt werden. Die obere flüssige Schicht wird abgegossen, der Niederschlag zentrifugiert. Zu 1 Teil des Zentrifugats werden 4 Teile einer 0,25proz. Kalilaugelösung hinzugefügt, gekocht und nochmals zentrifugiert. Aus dem Niederschlage hergestellte Ausstrichpräparate werden gefärbt.

Auf diese Weise haben wir 20 Sputa untersucht. Wir konnten in nach Ziehl-Neelsen gefärbten Ausstrichpräparaten Häufchen von Tuberkelbazillen in vereinzelten Gesichtsfeldern beobachten. In 3 Fällen, in denen wir auf gewöhnlichem Wege keine Tuberkelbazillen fanden, konnten wir mit Hilfe der Ellermann-Erlandsenschen Methode

in 2—3 Gesichtsfeldern kleine Häufchen zu 3—4—5 Exemplaren beobachten. Wir sind der Ansicht, daß diese Methode eine „Anhäufung" von Bazillen in bestimmten Teilen des homogenisierten Sputums zu bewirken imstande ist. Ganz besonders zeigt sich diese Eigenschaft in den Präparaten aus Sputa, in denen schon mit gewöhnlichen Färbungsmethoden große Bazillenmengen nachgewiesen worden sind; in diesen Fällen sehen wir die Tuberkelbazillen nestartig gelagert. Andererseits hat die Ellermann-Erlandsensche Methode auch ihre Nachteile, die darin bestehen, daß sie viel komplizierter als die Antiforminmethode ist, und daß nicht alle Bakterien, die im Sputum sich treffen können, bei dieser Methode aufgelöst werden, wodurch das Auffinden von Tuberkelbazillen erschwert wird. Auch das Aufkochen des Zentrifugates kann die nicht standhaften Tuberkelbazillen zerstören. Wir ziehen deswegen die Antiforminmethode vor, die viel einfacher ist und in vielen Fällen gute Dienste für diagnostische Untersuchungen leistet.

Auf Grund unserer Beobachtungen kommen wir zu folgenden Schlüssen:

1) Von den neueren Färbungsmethoden für Tuberkelbazillen besitzt keine irgendwelche Vorzüge vor der Ziehl-Neelsenschen Methode, die für rein diagnostische Zwecke unersetzlich ist. Bei der Ziehl-Neelsenschen Färbung soll man das Präparat mit Fuchsin nicht aufkochen, sondern nur bis zur Dampfbildung erwärmen. Große Dienste leistet auch die Much-Weißsche Methode zum Auffinden nicht säurefester Tuberkelbazillen und Körnchen, die sehr oft im tuberkulösen Material vorkommen.

2) Bei der Untersuchung der Sputa auf Tuberkelbazillen sollen aus dem Sputum verdächtige Stückchen ausgewählt werden, was für den Erfolg der Untersuchung von großer Bedeutung ist. Diese Auswahl hängt vom Studium der makroskopischen Eigenschaften der Sputa ab.

3) Von den verschiedenen Antiforminmethoden zur Anreicherung der Tuberkelbazillen im Sputum ist die von Lorenz angegebene Modifikation (Bearbeitung des Sputums mit 15proz. Antiforminlösung während 24 Std. ohne nachfolgendes Aufkochen) die beste.

4) Die Homogenisierungsmethode nach Ellermann-Erlandsen steht in ihrer Leistungsfähigkeit der Antiforminmethode nach.

Nachdruck verboten.

Ueber Erfahrungen mit der v. Wassermannschen Tuberkulosereaktion und der Lezithinflockungsprobe bei Rindern und Kälbern.

[Aus dem Pathol. Institut (bakteriol.-chemische Abteilung) der Krankenanstalt, Bremen (Abteilungsvorsteher: Oberarzt Dr. Moeckel).]

Von **Helmut Wendt.**

Die Werturteile über die v. Wassermannsche Komplementbindungsreaktion auf aktive Tuberkulose beim Menschen bewegen sich

zwischen fast rückhaltloser Anerkennung und vollkommener Ablehnung. Im ganzen scheint aus den Ergebnissen der Nachprüfer hervorzugehen, daß die v. Wassermannsche Tuberkulosereaktion sowohl bei tuberkulös Erkrankten, als auch bei im klinischen Sinne Gesunden positiv gefunden wird, bei jenen jedoch in einem außerordentlich viel höheren Prozentsatz als bei diesen. Sie ist eine Gruppenreaktion insofern, als sie auch bei Syphilis manchmal positiv ausfällt; vermutlich reagieren auch Sera Lepröser mit dem v. Wassermannschen Antigen; wenigstens kann man es nach den Erfahrungen mit dem Besredkaschen Antigen annehmen. Wenn die Reaktion somit auch ihr anfängliches Ziel, eine sichere Reaktion auf aktive Tuberkulose zu sein, zum Teil vielleicht verfehlt hat, so ist sie damit nicht bedeutungslos, eröffnet sie uns doch vielleicht manchen Einblick in das Wesen der tuberkulösen Erkrankung. Die weiteren Beobachtungen müssen zeigen, wie weit sie auch für die Prognostik der Tuberkulose in Frage kommt. Ritter (1) u. a. weisen wohl mit Recht darauf hin, daß es eine Reaktion auf aktive Tuberkulose im klinischen Sinne überhaupt nicht geben kann und nie geben wird. Es liegt dies an der Unklarheit des Begriffes „aktiv". Was streng wissenschaftlich als aktiv bezeichnet werden soll und muß, ist noch lange nicht für den Kliniker aktiv, d. h. progredient und behandlungsbedürftig. Man kann wohl Ritter zustimmen, wenn er zwischen einer nützlichen Aktivität, worunter ein geringer Prozeß mit lebenden Bazillen, der den Körper dauernd zur Bildung von Antikörpern anregt, zu verstehen ist, und einer schädlichen Aktivität, der der Körper allmählich zum Opfer fällt, unterscheidet. Der Ausdruck sowohl der nützlichen wie der schädlichen Aktivität müßte aber die v. Wassermannsche Reaktion sein unter der Voraussetzung, daß sie spezifisch wäre. Tatsächlich reagieren nach unseren Erfahrungen etwa 8 Proz. der Gesunden nach v. Wassermann positiv. Sie würden nach obiger Auffassung die mit einem nützlichen aktiven Prozeß Behafteten repräsentieren.

Diejenige Spezies, welche nächst dem Menschen am meisten von der Infektion mit Tuberkulose betroffen ist, ist wohl das Rind. Die Durchseuchung der Rinder mit Tuberkulose in den Ländern der gemäßigten Zone, wo die Tiere einen großen Teil des Jahres im Stall zubringen, ist eine außerordentlich hohe. Wie in der humanen Medizin, ist deshalb auch in der Veterinärmedizin der Besitz eines zuverlässigen Verfahrens zum Nachweis eines aktiven, vorgeschrittenen tuberkulösen Prozesses ein lange gehegter Wunsch. Ich muß es mir versagen, auf die zahlreichen Bestrebungen einzugehen, geeignete Antigene darzustellen, um damit auf serologischem Wege zu einer Diagnose zu kommen, und verweise in diesem Zusammenhang auf die Literaturangaben bei J. B. Meier (2) und Pfannenstiel (3).

Es war demnach sehr naheliegend, nachdem auf der Abteilung schon Erfahrungen über die Brauchbarkeit der v. Wassermannschen Reaktion beim Menschen gesammelt waren, die Untersuchungen auf die Rindertuberkulose auszudehnen. Ueber Untersuchungen dieser Art ist bereits von anderer Seite kurz berichtet worden, und zwar von Richters (4). Richters fand bei ca. 98 Proz. sicher tuberkulöser Rinder starke, komplette Hemmungen und spricht der v. Wassermannschen Reaktion für die Diagnose der aktiven Tuberkulose beim Rind große Bedeutung zu. Unsere Arbeiten wurden während des Sommers ausgeführt, zu einer Zeit also, wo erfahrungsgemäß die Häufig-

keit der Tuberkulose beim Schlachtvieh wesentlich geringer ist als im Frühjahr, wo die Züchter das in Ställen überwinterte, weniger gut gedeihende und kränkelnde Vieh auslesen und zur Schlachtbank führen. Ein verhältnismäßig großer Teil hiervon hat eine Tuberkulose. — Auch die Sera zahlreicher Kälber wurden in die Untersuchung einbezogen. — Das Blut wurde bei der Schlachtung der Tiere aus den spritzenden Halsgefäßen aufgefangen. Der pathologische Sektionsbefund wurde uns einige Tage später von den Herren Tierärzten des Bremer Schlachthofes in liebenswürdiger Weise zugestellt. Bei der Sektion wurden in der üblichen Weise die Bronchial-, Mediastinal-, Mesenterial-, und peripheren Lymphdrüsen durch mehrere Schnitte zerlegt und grob auf tuberkulöse Veränderungen durchsucht. Die Lungen und übrigen Organe wurden grob durchtastet und erhielten dann ebenfalls mehrere Schnitte durch das Parenchym. Die serösen Häute wurden einer Besichtigung unterzogen. Es ist selbstverständlich, daß bei dieser Technik geringere tuberkulöse Veränderungen in der Regel dem Obduzenten entgehen werden.

Die Sera von Kälbern zeigten gegenüber denen der Rinder einen ohne weiteres in die Augen fallenden Unterschied. Während die Rindersera fast ohne Ausnahme eine oft recht intensive Gelbfärbung aufwiesen, wurde diese bei Kälbern fast stets vermißt. Zur ungefähren Orientierung über den Eiweißgehalt der Sera bei Rindern und Kälbern wurde eine Serie von 23 Seren nach der Reaktion von Matéfý geprüft. Wegen des den Seren dieser Spezies eigentümlichen hohen Globulingehaltes wurden die Sera in der Verdünnung 1 : 2 mit physiol. Kochsalzlösung untersucht. Die Ablesung fand bereits nach 15 Min. statt. 13 Rindersera reagierten sämtlich +++, von 10 Kälbersera 5 ⊖, 4 +, 1 ++. Trockensubstanzbestimmungen bei 2 Rinder- und 2 Kälberseren ergaben folgende Zahlen: Rind I 9,58 Proz., Rind II 8,97 Proz., Kalb I 6,74 Proz., Kalb II 7,40 Proz. Die Sera von Kälbern scheinen also im allgemeinen wasserreicher zu sein als die von Rindern. Doch vermögen diese Unterschiede allein den so verschiedenen Ausfall der Matéfýschen Reaktion meines Erachtens nicht zu erklären. Rindersera haben wohl im allgemeinen einen höheren relativen Globulingehalt als die von Kälbern. Genauere Angaben macht Handovsky (5), der sehr große individuelle Schwankungen in der Zusammensetzung der Sera normaler Tiere fand. Ueber die Schwankungen, die er als physiologische bezeichnet, sagt er folgendes: Es besteht:

„1. Eine Abhängigkeit vom Alter; Kälbersera (. . . .) sind eiweißärmer und stets globulinärmer als die Sera ausgewachsener Rinder (sogar gelegentlich euglobulinfrei). — 2. Eine Abhängigkeit von der Jahreszeit; im Sommer haben wir wesentlich mehr albuminreiche Sera und höhere Albumingehalte, im Winter wesentlich mehr globulinreiche Sera und höhere Globulingehalte beobachtet, ... — 3. Eiweißärmere Sera erwiesen sich meist auch als euglobulinärmer; eine Erscheinung, die der an pathologischen Seren beobachteten entsprechen würde, daß eine Eiweißvermehrung zumeist mit einer Globulinvermehrung einhergeht . .“

Ich werde auf diese Unterschiede später zurückkommen.

A. v. Wassermannsche Tuberkulosereaktion.

Bei der Anstellung unserer Komplementbindungsversuche verfuhren wir genau so, wie v. Wassermann es für die Reaktion am Menschen angegeben hat, und bedienten uns des im Handel erhältlichen Antigens,

das meines Wissens aus humanen Tuberkelbazillen hergestellt wird. Dadurch, daß wir in einer Serie neben den Serumkontrollen solche von menschlichen Seren mitlaufen ließen, überzeugten wir uns davon, daß in der komplementbindenden Wirkung von Rinder- und Menschenseren kein wesentlicher Unterschied besteht.

Eigenartig und bisher nicht völlig aufgeklärt ist die Rolle, die das Lezithin bei der Reaktion spielt. Ist es ein Verstärker oder handelt es sich um Seitenkettenwirkung im Sinne Ehrlichs; diese Fragen harren noch der Beantwortung. Beide Komponenten, die mit Tetralin vorbehandelten Bazillen und das Lezithin, müssen nach v. Wassermann in einem bestimmten Verhältnis in dem Antigen enthalten sein. Richters (4) berichtet, daß er mit dem lezithinfreien Antigen bei Seren tuberkulöser Rinder keine oder nur flüchtige Reaktionen erzielte. Wir untersuchten eine größere Anzahl unserer Rinder- und Kälberseren außer mit der Lezithinbeladung, wie v. Wassermann sie angibt, auch mit der Hälfte und $^1/_4$ dieser Menge und ohne jede Lezithinbeladung. Auch mit den 3 letzteren Antigenen konnten wir — wenn auch weniger zahlreiche, — positive Reaktionen erzielen. Einige unserer Kälbersera reagierten sogar mit dem unbeladenen Antigen deutlich stärker als mit dem beladenen. — Endlich wurde eine Serie mit Lezithin allein als Antigen durchgeführt, mit dem Erfolg, daß in keinem Falle eine Komplementbindung eintrat, höchstens schwache, flüchtige Reaktionen wurden hier und da beobachtet.

In folgender Tabelle seien die Resultate, in Prozenten zusammengestellt, wiedergegeben. Auf Veröffentlichung der ganzen Versuchsprotokolle muß ich wegen Platzmangels verzichten.

Tabelle I.

Es reagierten

a) mit dem v. Wassermannschen Antigen

von 150 Rindern		von 110 Kälbern	
+++	60,10 Proz.	+++	10,90 Proz.
++	23,56 „	++	10,90 „
+	9,20 „	+	23,63 „
θ	7,14 „	θ	54,57 „

b) mit dem Antigen mit der Hälfte der Lezithinbeladung

von 33 Rindern		von 10 Kälbern	
+++	24,35 Proz.	+++	0 Proz.
++	33,45 „	++	0 „
+	15,20 „	+	20 „
θ	27,00 „	θ	80 „

c) mit dem Antigen mit einem Viertel der Lezithinbeladung

von 38 Rindern		von 17 Kälbern	
+++	36.90 Proz.	+++	12,00 Proz.
++	21,00 „	++	0 „
+	32.10 „	+	23,50 „
θ	10,00 „	θ	64,50 „

d) mit dem Antigen ohne Lezithinbeladung

von 55 Rindern		von 72 Kälbern	
+++	10.90 Proz.	+++	4,17 Proz.
++	14,55 „	++	4,17 „
+	45,46 „	+	9.72 „
θ	29,09 „	θ	81,94 „

In dieser Tabelle sind die Resultate mit 10 Rinder- und 2 Kälberseren nicht enthalten, die wegen Eigenhemmung nicht abzulesen waren.

Von den in Tab. I aufgeführten Tieren hatten einen pathologischen Sektionsbefund.

Tabelle II.

	Wassermann		Sektionsbefund
	mit Lezithinbeladung	ohne Lezithinbeladung	
8-jähr. Kuh	+++	++	Lungen- und Lebertbc.
7-jähr. „	+++	+++	Lungentbc.
5-jähr. Ochse	+++	++	„
3-jähr. Kuh	+++	++	„
6-jähr. Ochse	+++	+++	„
5-jähr. Kuh	+++	+++	Lungen, Pleura, Leber, Milz, Magen, Darm, Peritoneum, Eutertbc.
4-jähr. Ochse	+++	+	Leberdistomatose
7-jähr. Kuh	+++	+	Pyelonephritis
4-jähr. „	0	0	Mastitis
7-jähr. „	+++	+++	„

	Wassermann		Sektionsbefund
	mit voller Lezithinbeladung	mit $^1/_4$ Lezithinbeladung	
4-jähr. Kuh	+++	+++	Lungen, Leber, Pleuratbc.
2-jähr. „	+	+	Kalkherd der Lunge

In Tabelle I fällt sofort der große Unterschied im Ausfall der Reaktionen zwischen Rindern und Kälbern auf. Bei Rindern über 80 Proz. deutlich positive Reaktionen mit dem v. Wassermannschen Antigen, bei Kälbern über 50 Proz. negative. Ebenso auffallend ist fernerhin, daß auch die positiv reagierenden Rinder und Kälber, mit Ausnahme der in der Tabelle II aufgeführten Rinder, bei der Sektion als gesund befunden wurden. Zu entscheiden, ob die übrigen positiv reagierenden Tiere nun wirklich eine Tuberkulose haben, die nur dem Obduzenten entgangen ist, oder ob etwa die Rinder von einer Infektion während der Stallzeit, denn diese ist wohl die Hauptinfektionsgelegenheit für die Tiere, also von einer Infektion, die erst relativ kurze Zeit zurückliegt, noch Reaktionskörper im Blut besitzen und deswegen nach v. Wassermann positiv reagieren, ist außerordentlich schwierig. Hilfsreaktionen wie die Tuberkulinprobe konnten leider aus äußeren Gründen nicht angestellt werden. Erklären könnte man sich vielleicht den Unterschied zwischen den zahlreichen positiven Reaktionen bei Rindern und den demgegenüber doch relativ wenigen positiven Reaktionen bei Kälbern dadurch, daß diese auch der Hauptinfektionsgefahr mit Tuberkulose noch nicht ausgesetzt gewesen sind. Zur Klärung der Frage wären Untersuchungen an Tieren sehr wertvoll, die mit dem Tuberkelbazillus sicher noch nicht in Berührung gekommen sind. Wir werden wahrscheinlich in absehbarer Zeit die Gelegenheit haben, nordamerikanische Weidetiere zu untersuchen.

Wie weit man somit aus dem Ausfall der v. Wassermannschen Reaktion beim Rind Schlüsse auf die Krankheitsverbreitung (Epidemiologie) der Tuberkulose ziehen darf, muß dahingestellt bleiben. Es bleibt immer der Einwand übrig, daß die positiven Reaktionen wenigstens zum Teil durch ein Uebergreifen anderer, nicht durch die

tuberkulöse Infektion hervorgerufener Reaktionskörper auf das Antigen bedingt seien, ein Einwand, den man zum Teil infolge des Fehlens sicher tuberkulosefreier Tiere nicht beweisend widerlegen kann. Auch kann kein Urteil darüber gewonnen werden, ob das Ergebnis mit dem v. Wassermannschen Antigen oder das mit einem der 3 modifizierten Antigene die Verhältnisse am besten trifft.

Für die Praxis kommt die Reaktion jedenfalls meines Erachtens für die Diagnosestellung in dieser Form vorerst nicht in Frage, da sie nicht die Fälle mit fortgeschrittener Tuberkulose von den anderen herauszuheben gestattet.

B. Die Lezithinflockungsprobe.

Porges und Meier (6) fanden 1907, daß das Serum von Syphilitikern eine Emulsion von Lezithin ausflockt. Im Anschluß an diese Entdeckung zeigten Weil und Braun (7), daß die genannte Fähigkeit in besonders hohem Grade dem Serum von Rindern zukommt. Eingehender befaßte sich mit der Reaktion Toyosumi (8). Er glaubt, daß es sich bei der Lezithinflockung um die Wirkung irgendwelcher Antikörper handelt; einen eigenen, spezifisch gegen Lezithin gerichteten Antikörper lehnt er ab. Er spricht ferner die Vermutung aus, daß auch menschliche Sera, welche die Fähigkeit besitzen, Lezithin auszuflocken, dies vermöge ihres gesteigerten Antikörpergehaltes tun, und erwähnt einen Versuch von Weil und Braun, die bei 6 Typhuskranken in 2 Fällen Lezithinausflockung beobachteten, und zwar bei den Seren, die eine besonders hohe Agglutinationskraft besaßen. Im vergangenen Jahre zeigten Sachs und Klopstock (9), daß es gelingt, mit dem Serum zahlreicher Kranker eine Lezithinflockung hervorzurufen, wenn man die Lezithinemulsion durch Zusatz einer geringen Menge von Kalziumchlorid labil macht. Im besonderen reagieren bei dieser Anordnung eine große Anzahl Sera von Tuberkulösen positiv, doch ist die Reaktion für Tuberkulose nicht spezifisch.

Wir bedienten uns bei unseren Versuchen der Sachs-Klopstockschen Anordnung, da wir die Abhandlung von Toyosumi erst in die Hände bekamen, als unsere Arbeit nahezu abgeschlossen war.

Die Versuche an 128 Rindern und 96 Kälbern hatten folgendes Ergebnis: Es reagierten:

Rinder:	+ :	84,4 Proz.
	— :	15,6 „
Kälber:	+ :	8,23 „
	— :	91,77 „

Von diesen Tieren hatten die in Tab. II aufgeführten einen pathologischen Sektionsbefund. Sie reagierten positiv, nur Tier Nr. 2 negativ. Der Unterschied ist eklatant: Bei Rindern weit überwiegend positive, bei Kälbern negative Reaktionen.

Um ein Urteil über die Rolle des Kalzium beim Zustandekommen der Flockung zu gewinnen, führten wir an 24 Seren von Rindern und Kälbern parallele Versuchsreihen aus, einmal mit, einmal ohne Zusatz von $CaCl_2$ zur Lezithinemulsion. Es zeigte sich eine fast vollkommene Uebereinstimmung im Ausfall beider Serien. Es bedarf also, um mit Rinderserum eine Lezithinflockung hervorzurufen, des Zusatzes von Kalziumionen nicht. Das brachte uns auf den Gedanken, es könnte vielleicht das Serum der mit dem Grünfutter reichliche Kalkmengen aufnehmenden Rinder im Gegensatz zu dem der oft noch saugenden

Kälber so kalkhaltig sein, daß dieser hohe Kalkgehalt die Lezithinflockung bewirke. Um die Frage zu klären, wurde im Anschluß an obige Versuchsreihe folgender Versuch ausgeführt:

Zu je 1 ccm einer Serumkochsalzverdünnung 1 : 5 wurde, um das Kalzium des Serums auszufällen, je ein Tropfen einer gesättigten Natriumoxalatlösung zugesetzt. Nach 2stünd. Stehen im Brutschrank hatte sich ein zarter Anflug — offenbar von Kalziumoxalat — am Boden der Röhrchen gebildet. Von der überstehenden Flüssigkeit wurden je 0,5 ccm abpipettiert und mit je 0,25 ccm der kalkfreien Lezithinemulsion versetzt. Es zeigte sich eine vollkommene Uebereinstimmung im Verhalten der oxalierten und nichtoxalierten Sera. Also spielt wohl bei Rinderseren das Kalzium — wenigstens das ionisierte — keine irgendwie ausschlaggebende Rolle beim Zustandekommen der Lezithinflockung.

Die Ergebnisse mit der Lezithinflockungsprobe berechtigen meines Erachtens zu folgender Schlußfolgerung: die positive Lezithinflockung der Sera von Rindern ist offenbar nicht ein dieser Spezies physiologischer Weise zukommendes Merkmal, denn wir vermissen sie bei fast allen Kälbern und auch einem Teil der erwachsenen Rinder. Vielmehr scheint mir dabei eine Begleiterscheinung eines pathologischen Vorgangs vorzuliegen, und ich pflichte Weil und Braun bei, die nach der bereits zitierten Arbeit von Toyosumi die Annahme machten, daß es sich dabei um den Ausdruck einer Immunkörperwirkung handeln könnte.

Berücksichtigen wir die außerordentliche Häufigkeit der Tuberkulose bei Rindern, so liegt die Vermutung nahe, in den meisten Fällen eine tuberkulöse Infektion als die Ursache der Lezithinflockung anzunehmen. Das führte dann weiter dazu, die Ergebnisse der Wassermannschen Reaktion mit den Ergebnissen der Lezithinflockungsprobe zu vergleichen. Ich gebe folgende Uebersicht:

I. Rinder (128 Tiere).

a) positive Lezithinreaktion gaben 84,4 Proz., hiervon waren nach v. Wassermann:

+++ : 60.2 Proz.
++ : 23,2 „
+ : 7,4 „
θ : 9,2 „

b) negative Lezithinreaktion gaben 15,6 Proz., hiervon waren nach v. Wassermann

+++ : 70 Proz.
++ : 25 „
+ : 0 „
θ : 5 „

II. Kälber (96 Tiere).

a) positive Lezithinreaktion gaben 8,23 Proz., hiervon waren nach v. Wassermann:

+++ : 49,5 Proz.
++ : 25,5 „
+ : 25,0 „
θ : 0 „

b) negative Lezithinreaktion gaben 91,77 Proz., hiervon waren nach v. Wassermann:

+++ : 9,10 Proz.
++ : 11.34 „
+ : 26,14 „
θ : 53,42 „

Während wir also bei den Rindern kein absolutes Parallelgehen der beiden Reaktionen feststellen können, sondern auch bei den mit

Lezithin negativ reagierenden Seren einen hohen Prozentsatz positiver Wassermannscher Reaktionen finden, geht aus den Versuchen bei den Kälbern wenigstens hervor, daß alle mit Lezithin positiv reagierenden Sera auch nach v. Wassermann positiv reagierten, während die mit Lezithin negativ reagierenden Sera nach v. Wassermann überwiegend negativ oder schwach positiv reagierten. Doch kamen bei letzterer Kategorie auch stärkere Reaktionen nach v. Wassermann vor.

Weiter versuchten wir Beziehungen zwischen den beiden Reaktionen durch Absättigungsversuche aufzudecken:

1) Die Sera von 12 Rindern und 12 Kälbern wurden mit der bei der Sachs-Klopstockschen Versuchsordnung üblichen Lezithinmenge gemischt, so daß eine Serumverdünnung 1:5 resultierte. Nach 24stünd. Stehen im Brutschranke wurde zentrifugiert, wobei in den meisten Fällen, aber nicht immer, eine vollständige Abtrennung der Lezithinflocken erzielt werden konnte, und mit der überstehenden Flüssigkeit der Komplementbindungsversuch nach v. Wassermann ausgeführt. Die Resultate deckten sich so gut wie vollständig mit den Ergebnissen des Originalversuchs.

2) Dieselben Sera wurden mit v. Wassermannschem Antigen versetzt (d. h. mit mit Lezithin beladenen Bazillen), so daß eine Verdünnung 1:5 resultierte, aber zugleich die im Komplementbindungsversuch erforderliche Antigenmenge gewahrt wurde, und 2 Std. im Brutschrank stehen gelassen. Dann wurde zentrifugiert und mit 0,5 ccm der klaren Flüssigkeit die Lezithinflockungsprobe ausgeführt. Es war nicht in einem einzigen Falle eine Abschwächung der Flockungen im Vergleich zum Originalversuch festzustellen.

Der negative Ausfall dieser Versuche scheint gegen eine Identität der bei den beiden Reaktionen wirksamen Prinzipien zu sprechen. Gegen die Versuchsanordnung könnte vielleicht der Einwand erhoben werden, die verwandten Lezithin- und Bazillenmengen seien zur Absättigung unzureichend gewesen. Es kam uns aber darauf an, die für die beiden Reaktionen vorgeschriebenen Versuchsbedingungen nach Möglichkeit erst einmal einzuhalten. Darauf stellten wir einige andere Absättigungsversuche an, bei denen wir massivere Mengen von Antigen anwandten.

Tabelle III.

	2-jähr. Kuh	2-jähr. Kuh	4-jähr. Kuh	7-jähr. Kuh	4 Wochen altes Kalb
Sachs-Klopstocksche Lezithinreaktion ohne $CaCl_2$-Zusatz	θ	+	+	+	θ
Lezithinreaktion nach Vorbehandlung mit					
Tuberkelbazillen	θ	+	+	+	θ
tetralinisierten Bazillen	θ	+	+	+	θ
mit Lezithin beladenen tetralinisierten Tuberkelbazillen	—	—	+	—	θ
Heubazillen	θ	+	+	+	θ
Hefe	θ	+	+	+	θ
Hammelblutkörperchen	θ	+	+	+	θ
Kieselgur	θ	+	+	+	θ
Permutit	θ	+	+	+	θ
Tierkohle	θ	+	+	+	θ
Kreide	θ	θ	θ	θ	θ
Kaolin	θ	θ	+	θ	θ

Außer den in der folgenden Tabelle aufgeführten Antigenen bakterieller Herkunft wurden noch Hefe, gewaschene Hammelblutkörperchen und einige viel als Adsorbentien in der Kolloidchemie benutzte Stoffe mineralischer Natur in die Untersuchung einbezogen. Wir versetzten 2 ccm einer Serumverdünnung 1 : 5 mit dem betreffenden Stoffe in einer Menge von $^1/_{10}$ bis $^1/_5$ des Volumens des verdünnten Serums. Einwirkungsdauer 2 Std. (s. Tab. III, S. 33).

Wie aus der Tabelle III hervorgeht, gelang es unter Benutzung der verschiedenen Bazillenpräparate, der Hefe und der Hammelblutkörperchen in keinem Falle eine deutliche Abschwächung oder Aufhebung der Lezithinreaktion zu bewirken. Von den mineralischen Stoffen waren Kieselgur, Permutit und Tierkohle ohne Wirkung. Kreide und Kaolin dagegen hoben die Flockung auf. Auch Toyosumi (8) gelang es durch Behandlung von Rinderseren mit einer Agarkultur von Typhusbazillen oder Choleravibrionen nicht, die Agglutination gegenüber Lezithin aufzuheben. Wohl aber blieb die Agglutination aus bei Behandlung mit Typhusbazillen und Choleravibrionen nacheinander. Weitere Untersuchungen, um dem Wesen der Lezithinreaktion näher zu kommen, behalte ich mir vor.

Wenn wir uns noch einmal der Resultate mit der v. Wassermannschen Reaktion und der mit der Lezithinreaktion erhaltenen erinnern, so ergab sich immerhin ein auffallender Parallelismus insofern, als die bei weitem am meisten positiven Resultate sowohl mit der v. Wassermannschen Reaktion, wie auch mit der Lezithinreaktion bei Rindern und die meisten negativen bei Kälbern gefunden wurden. Ich möchte nur noch kurz auf die Frage eingehen, ob sich vielleicht auch Beziehungen zwischen den beiden genannten Reaktionen und dem Globulingehalt der Sera ergeben. Erinnern wir uns der Ergebnisse Handowsky's und seiner Mitarbeiter, die beträchtliche Schwankungen im Globulingehalt bei Rindern und höhere durchschnittliche Globulinwerte bei Rindern als bei Kälbern fanden, so muß die Vermutung aufkommen, daß ein Zusammenhang zwischen Lezithinflockung und Globulinvermehrung der Sera besteht. Beide Erscheinungen wären dann Ausdruck und Begleiterscheinung eines Immunisierungsprozesses, denn die Auffassung von Weil und Braun und Toyosumi, daß Sera, welche die Fähigkeit haben, Lezithin auszufällen, dies vermöge ihres gesteigerten Antikörpergehaltes tun, scheint gut begründet. Berücksichtigen wir die außerordentliche Häufigkeit der Infektion mit Tuberkulose beim Rind, so führt uns das zu der Schlußfolgerung, daß in den meisten Fällen eine solche Infektion sowohl für die Lezithinflockung als auch für die Globulinvermehrung verantwortlich oder mitverantwortlich zu machen ist. Dazu kommt bestätigend der hohe Prozentsatz positiver Wassermannscher Reaktionen beim Rind. Sollte vielleicht auch die ebenfalls von Handowsky gefundene Tatsache, daß die Rindersera im Winter globulinreicher sind als im Sommer, damit im Zusammenhang stehen, daß die Rinder bei dem unhygienischen Stallaufenthalt während des Winters in einem lebhafteren Abwehrkampf gegen die wieder aufflackernde oder neu auftretende Tuberkulose stehen, als im Sommer auf der Weide?

Zusammenfassung.

Die v. Wassermannsche Reaktion auf aktive Tuberkulose wurde bei den zur Beobachtung gekommenen Fällen von vorgeschrittener

Tuberkulose der Rinder positiv gefunden. Doch wurden positive Reaktionen auch bei der großen Mehrzahl aller überhaupt untersuchten Rinder erhalten, auch solchen, bei denen die Sektion keinen pathologischen Befund nachwies. Demgegenüber reagierten die Sera von Kälbern weit überwiegend negativ.

Zur Diagnose einer vorgeschrittenen Tuberkulose ist die Reaktion ungeeignet.

Mit der Lezithinflockungsprobe nach Sachs-Klopstock reagierten die Sera von Rindern fast immer positiv, die von Kälbern meist negativ; im übrigen gingen die mit der Flockungsprobe erhaltenen Resultate mit dem Ausfall der Wassermannschen Reaktion nicht immer parallel.

Es werden Zusammenhänge zwischen tuberkulöser Infektion der Rinder, Lezithinflockung und Globulinvermehrung der Sera vermutet.

Literatur.

1) Ritter, Beiträge zur Klinik der Tuberkulose. Bd. 59. 1924. S. 57. — 2) Meier, J. B., Die Bedeutung der Komplementbindungsreaktion für die Diagnostik der Rindertuberkulose. [Inaug.-Dis.] München. 1924. — 3) Pfannenstiel, Ergebnisse der Serodiagnostik der Tuberkulose und Lepra. (Ergebn. d. Immunitätsf. Bd. 6. 1924. S. 103. — 4) Richters, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Refer. Bd. 76. 1924. S. 92. — 5) Handowsky, Münch. med. Woch. 1924. S. 708. — 6) Porges u. Meier, Berl. klin. Woch. 1907. Nr. 51. — 7) Weil u. Braun, zit. nach Toyosumi (8). — 8) Toyosumi, Wien. klin. Woch. 1908. S. 611. — 9) Sachs u. Klopstock, Dtsch. med. Woch. 1923. S. 1292.

Eigelbwasser zur Züchtung von Tuberkelbazillen aus Liquor und Ascites, seine Verwendung zur Antigenherstellung für die Serodiagnostik der Tuberkulose.

(Aus der I. medizinischen Abteilung des Städtischen Krankenhauses Neukölln (Direktor: Prof. Ehrmann).]

Von **Kurt Weise.**

Ausgehend von den Angaben Besredkas über die Kultur von Tuberkelbazillen in Eigelb (1), versuchte ich, in gleicher Weise Tuberkelbazillen zu züchten und damit ein Antigen für die Serodiagnostik der Tuberkulose zu gewinnen. Besredka gibt gleich im Beginn seiner Arbeit an, „es sei ihm von mehreren Seiten berichtet worden, daß die Zubereitung des Eiernährbodens auf Schwierigkeiten stoße, so daß der laufende Gebrauch dadurch gehindert sei“, und teilt dann eine vereinfachte Technik mit. In mehrfachen Versuchen gelang es mir jedoch nicht, einen „in dichter Schicht leicht opak“ bleibenden Nährboden zu erhalten, vielmehr erwies sich die Eigelbflüssigkeit nach dem Sterilisieren in dem gegen Licht gehaltenen, zur Hälfte gefüllten Glaskölbchen stark getrübt und enthielt auch trotz vorangegangener Fil-

tration mit Glaswolle einen Bodensatz von ausgefälltem Eigelb. Ein fast wasserklares Antigen, wie Besredka es versendet, erhielt ich daher niemals. Auch durch nachträglichen Alkalizusatz klärte sich der Nährboden nicht auf.

Nach mehreren Versuchen konnte ich nun feststellen, daß man alle diese Schwierigkeiten sofort überwindet, wenn man das durch Alkalizusatz völlig geklärte Eigelbwasser erst sterilisiert und danach durch Säurezusatz abstumpft.

Die Herstellungstechnik ist folgende:

2 Eier, mit Seife und Bürste gereinigt, mit brennendem Spiritus desinfiziert, an beiden Polen abgeflammt, werden mit sterilen Instrumenten geöffnet; das Eiweiß wird entfernt. Die so erhaltenen ca. 35 ccm Eigelb werden in einem Meßzylinder getan, mit neutralem Aq. dest. füllt man auf 300 ccm auf. Von einer $^1/_4$ n. NaOH setzt man ca. 9—12 ccm. je nach Beschaffenheit des Eigelbs zu. (Man verwende möglichst frische Eier.) Es muß optimalste Klärung des Nährbodens erreicht sein. Nunmehr wird mit Aq. dest., das man vorher schon auf seine Neutralität geprüft hat, auf 700 ccm aufgefüllt, so daß eine 5proz. Eigelbwasserlösung entsteht, die man durch Glaswolle filtriert. 100—200 ccm fassende Kölbchen werden mit 30—50 ccm Nährboden beschickt und im Autoklaven bei 110° 20 Min. lang sterilisiert. Das jetzt noch stark alkalische Nährmedium stumpft man durch Zusatz von $^1/_4$ n. HCl ab (ungefähr 0,075—0,125 ccm pro 10 ccm), bis sich neutrales Lackmuspapier kaum noch bläut. Die Wasserstoffionenkonzentration nach Michaelis war vor dem Zusatz von Säure pH = ca. 7,8—8,0, nachher ca. 7,2—7,4.

Selbstverständlich trübt sich das Eigelbwasser beim Säurezusatz etwas, jedoch bei weitem nicht in dem Maße, als wenn man es sofort neutral oder schwach alkalisch herstellt und dann sterilisiert. Es ist nun wirklich eine „in dichter Schicht leicht opak" bleibende Flüssigkeit, deren Herstellung niemandem Schwierigkeiten bereiten wird. Das Eigelbwasser bleibt so weit durchsichtig, daß man schon makroskopisch eine Tuberkelbazillenvermehrung erkennen, bei einiger Uebung sogar Reinkulturwachstum von Verunreinigungen durch andere Bakterien unterscheiden kann. Ein mir von Herrn Prof. Schilling und Frl. v. Falkenhayn aus dem Institut „Robert Koch" freundlichst überlassener Tuberkelbazillenstamm (Bethge, auf Glyzerinbouillon gezüchtet) zeigte, daß die Wachstumsart weniger in Zöpfen als in Krümeln am Kolbenboden vor sich ging, nach 4—10 Tagen makroskopisch deutlich erkennbar. Auch mikroskopisch waren die Bazillen mehr in dicken, nach Ziehl-Neelsen intensiv rot gefärbten Klumpen als in Zöpfen gelagert, zahlreich jedoch auch einzeln liegend.

Nach 3—4 Wochen zeigte sich ein starker Bodensatz. In der Reinkultur bleibt das Eigelbwasser gleich hell; sind aber gleichzeitig andere Bakterien vorhanden, so trübt sich die Flüssigkeit schon nach 24—48 Std. Die Tuberkelbazillen vermehren sich zwar noch weiterhin nach meinen bisherigen Beobachtungen, jedoch in recht verschiedenem Maße, besonders wenn es zur Verklumpung des ganzen Nährbodens kommt, wie ich es gelegentlich gesehen habe.

Das so hergestellte Eigelbwasser benutzte ich, um aus Liquor von Kranken mit Meningitis tuberculosa die Bazillen zu züchten. Bekanntlich gelingt der direkte Nachweis der Tuberkelbazillen aus dem Spinnwebennetz nicht so sicher, wie es theoretisch der Fall sein müßte. Gewiß wird der Kliniker auch ohne Bazillennachweis die richtige Diagnose stellen, auch wird oft genug die Autopsie die bakteriologische Diagnose überholen; dennoch dürfte die Anwendung eines so einfachen Verfahrens die Tuberkelbazillen leicht und sicher nachzuweisen, von Interesse

sein. Ich setzte dem mit 30—50 ccm Eigelbwasser gefüllten Kölbchen je nach der zur Verfügung stehenden Menge 1—5—10 ccm Liquor zu und stellte das Kölbchen in den Brutschrank. Von den mir bisher zur Verfügung gewesenen 6 Fällen von Meningitis tuberculosa konnte ich nach 4—10 Tagen ausnahmslos aus dem Liquor, teils in Reinkultur, teils mit anderen Bakterien durch nicht genügend sterile Entnahme verunreinigt, Tuberkelbazillen nachweisen. Bei den Reinkulturen war schon makroskopisch nach 4—10 Tagen aus dem bereits beschriebenen Wachstumszeichen zu ersehen, daß es sich um Tb-Bazillen handelte, was das mikroskopische Bild bestätigte. Waren bei den verunreinigten Kulturen im direkten Ausstrichpräparat aus der umgeschüttelten Kultur die Tb-Bazillen neben den zahlreichen anderen Bakterien nicht ohne weiteres nachweisbar, so reicherte ich einen Teil des bebrüteten Eigelbwassers in der üblichen Weise mit Antiformin an und erhielt ein Bild, das die Vermehrung der Bazillen trotz Verunreinigung, wenngleich in geringerem Maße, so doch deutlich erkennen ließ. Ich kann daher die Beobachtung Boekers (2), der Versuche mit dem nach Besredkas Angaben hergestellten Eigelbnährboden machte und dabei fand, daß „soweit nicht Verunreinigung durch fremde Bakterien störend einwirkte, sämtliche Kulturen angegangen sind", nur im Sinne eines langsameren und nicht so ausgiebigen Wachstums bestätigen.

Auch aus Ascites züchtete ich 2mal eine Tb-Bazillenreinkultur, 1 Fall blieb bei mehrfacher Untersuchung negativ.

Zur Weiterimpfung von verunreinigten Tb-Bazillenkulturen verwandte ich hochalkalisches, nicht abgestumpftes Eigelbwasser und erreichte dadurch ein geringeres Wachstum der beigemengten Keime, allerdings gleichzeitig eine langsamere Entwicklung der Tb-Bazillen. Sind die Tb-Bazillen erst an den stark alkalischen Nährboden (pH = 8,0) gewöhnt, so gedeihen sie bei Weiterimpfung besser und zeigen mitunter, wie ich beim Stamm Bethge beobachtete, die Form von Diphtheriebazillen, die sich bei Ueberimpfung auf schwach alkalisches Eigelbwasser wieder verliert.

Aus den so erhaltenen Reinkulturen versuchte ich ein Antigen herzustellen, das keine unspezifischen Eigenschaften hatte, vor allem also keinen positiven Ausfall bei Seren von Luetikern mit positiver Wassermannscher Reaktion aufwies, wie das bei dem Antigen von Besredka oft der Fall ist. Ebenso versuchte ich die Nährbodenhemmungen, wie sie F. v. Gutfeld u. E. Weigert (3) festgestellt haben, auszuschalten.

Als beste Herstellungsart erwies sich folgende:

Zentrifugieren einer 3—4 Wochen alten (auch älteren), gut gewachsenen Kultur, mehrmaliges Auswaschen mit phys. NaCl-Lösung, bis keine Nährbodenbeimengung mehr vorhanden ist. Auffülllen des Sediments auf ca. 15—20 ccm phys. NaCl-Lösung, danach 2 Std. mit Glasperlen schütteln und 24 Std. im Brutschrank stehen lassen. Abtöten der Bazillen im Dampftopf bei 100° 1 Std. lang, dann wieder 2 Std. schütteln.

Die Auswertung der dichten Bazillenemulsion geschieht im Antigenversuch nach der von v. Wassermann (4) für seinen Extrakt angegebenen Methode, wie überhaupt die Reaktion nach seinen Angaben und mit seinem Antigen parallel laufend von Herrn Dr. Landsberg und Frl. Lossow im path. Institut hier (Prosektor Dr. Ehlers) angesetzt wurde. Einige Prüfungen meines Antigens nahm ich selbst in Gemeinschaft mit Frl. Pedell vor. Es bleibt bemerkenswert, wie leicht die in der geschilderten Weise gewonnenen Kulturen ein brauchbares Antigen ergaben.

Das Resultat der 209 Seren von Kranken mit und ohne Tuberkulose, die gleichzeitig mit dem v. Wassermannschen und meinen Extrakten untersucht wurden, war folgendes:

Uebereinstimmend positiv 40, negativ 151. Bei 18 Seren Tuberkulöser ergaben sich Differenzen, und zwar waren 5 davon nur mit dem Wassermannschen Antigen positiv, mit meinem negativ, und umgekehrt 13 nur mit meinen Antigenen positiv.

Diese Abweichungen sprechen für die Notwendigkeit, entsprechend der Luesreaktion auch zur Serodiagnostik der Tuberkulose mehrere Extrakte zu verwenden. Dann auch innerhalb meiner Extrakte wurden gelegentlich geringe Schwankungen beobachtet.

Die Vorteile des beschriebenen Antigens sind: 1. gegenüber dem v. Wassermannschen ist die Einfachheit und Billigkeit in der Zubereitung und Anwendung (aus 1 Ei kann man Extrakt für mindestens 1000 Untersuchungen herstellen); 2. im Vergleich zum Antigen von Besredka, daß Mitreaktionen bei Seren von Luetikern nicht beobachtet wurden[1]); 3) daß die Nährbodenhemmung wegfällt.

Ueber den Wert der Reaktion überhaupt soll hier kein Urteil abgegeben werden.

Literatur.

1) Besredka, Ann. de l'Inst. Pasteur. T. 35. 1921. p. 291—293. — 2) Boeker, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 95. S. 344—346. — 3) F. v. Gutfeld u. Weigert, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 90. 1923. S. 134—142. — 4) v. Wassermann, Dtsch. med. Woch. 1923. S. 303—308.

Die mathematische Formulierung der zwischen Diphtherietoxin und -Antitoxin sich abspielenden Flockungsreaktion.

[Aus dem Institut für experimentelle Therapie „Emil von Behring", Marburg, Lahn (Direktor: Prof. Dr. Dold).]

Von Privatdozent Dr. **Hans Schmidt.**

Mit Hilfe der Ramonschen Reaktion (Flockung des Diphtherietoxins durch Antitoxin) kann man bekanntlich den Diphtherieantitoxingehalt eines Serums bestimmen, wenn man die flockende Eigenschaft des zur Prüfung benutzten Giftes kennt. Bezeichnet man nach Glenny und Okell (Journ. of Path. a. Bact. 1924, Vol. 27, p. 187) als den L_f-Wert eines Giftes diejenige Toxinmenge, die mit einer Antitoxineinheit (AE) optimale Flockung gibt, so ist es natürlich nötig, den L_f-Wert des Prüfungsgiftes zu kennen, bevor man zur Titration eines Antitoxins mit diesem Gifte schreiten kann. Da es zweckmäßig ist, zur Flockung hochwertiges Toxin zu nehmen, so wurde Di-Gift No. 342 der Behring-Werke, das sechsfach normal ist, als Prüfungsdosis gewählt, und dessen L_f-Wert nach dem Verfahren von Glenny und Okell folgendermaßen bestimmt:

1) Unspezifische Mitreaktionen sah ich in ein und derselben Versuchsserie bei einer anderen Herstellungsart des Antigens, und zwar 3mal unter 40 Fällen, diese betrafen 1 Lues laryngis, 1 Urämie und 1 abgelaufene Pneumonie.

Zu je 2 ccm Toxin wurden in Präzipitationsröhrchen zunächst 0,1, 0,2 usw. bis 1,0 eines gut im Tierversuch ausgewerteten Di-Heilserums (Di-Antitoxin) zugesetzt, das vorher 1:10 mit physiol. NaCl-Lösung verdünnt worden war. Die Verdünnung empfiehlt sich, weil die Abmessung der kleinen Serummengen sonst zu ungenau wird. Das Serum war 280fach. Die Röhrchen standen bei 37°. Nach einiger Zeit war optimale Flockung bei 0,6 und 0,7 ccm Serum eingetreten, so daß nun ein 2. Versuch mit Zwischenstufen angesetzt werden konnte, der optimale Flockung bei 0,66 ccm ergab. D. h. also, daß 2 ccm des Prüfungstoxins mit 0,66 ccm des 1:10 verdünnten 280fachen Di-Heilserums optimal flockten. Da 1 ccm 280 AE enthält, sind in 0,066 ccm des unverdünnten Serums (= 0,66 ccm des $^1/_{10}$ verdünnten Serums) 18,48 AE enthalten. Mit diesen 18,48 AE haben 2 ccm Toxin geflockt, also 9,24 AE mit 1 ccm Toxin und 1 AE mit $\frac{1}{9,24}$ = 0,108 ccm Toxin. Es hat also 1 AE mit 0,108 ccm Toxin geflockt. Der Flockungswert des Prüfungsgiftes wäre demnach 0,108.

Zur Auswertung eines unbekannten Serums wird dieses wiederum in steigenden Mengen zu je 2 ccm Toxin zugesetzt. Zweckmäßig wird das Serum vorher 1:50 verdünnt. Ist das Serum ganz unbekannt, so mischt man es zu gleichen Teilen mit z. B. 400fachem Serum. Der Titer kann dann nicht unter 200fach sein. Meistens wird man die ungefähre Titerhöhe wissen. Das Serum sei z. B. auf 600fach zu prüfen, dann wird man, wie aus der folgenden Tabelle klar wird, zunächst 2,0, 1,8, 1,6, 1,4, 1,2, 1,0 ccm Serumverdünnung zu je 2 ccm Toxin setzen. Optimale Flockung wird bei 1,6 und 1,4 ccm eintreten. In einer zweiten Serie mit 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7 ccm wird 1,5 ccm optimal flocken.

Es haben also 2 ccm Toxin mit 1,5 ccm Serum geflockt. Da L_f des Toxins = 0,108 ist, also 2 ccm Toxin 18,48 AE zur Flockung brauchen (siehe oben), müssen in 1,5 ccm des 1:50 verdünnten Serums 18,48 AE gewesen sein, also in 1 ccm dieses Serums 616 AE. Das Serum wäre also als 600fach zu bezeichnen. Man kann sich nun eine Tabelle auf dieser Grundlage errechnen, die — für das gleiche Prüfungsgift und bei 50facher Serumverdünnung — aus der Anzahl der ccm des Serums, die mit 2 ccm Toxin flocken, den Titer des Serums sofort abzulesen gestattet, und es umgekehrt ermöglicht, den Flockungsversuch so einzurichten, daß man die Zahl der ccm, die dem zu erwartenden Serumtiter entspricht, gleich in die Mitte der Versuchsreihe nimmt.

Für das obige Prüfungsgift und unter den obigen Versuchsbedingungen lautet die Tabelle:

Anzahl der ccm 1:50 verdünnten Serums, die mit 2 ccm Toxin (L_f = 0,108) flocken:	Titer des Serums
$9,2_4$	100
$4,6_2$	200
$3,0_8$	300
$2,3_1$	400
$1,8_{48}$	500
$1,5_4$	600
$1,3_2$	700
$1,1_5$	800
$1,0_{26}$	900
$0,92_4$	1000
0,77	1200
$0,61_6$	1500

Für die Praxis der Serumtiterbestimmung kommt nur die 1. Stelle nach dem Komma in Betracht. Bei graphischer Darstellung ergibt sich eine rechtwinklige Hyperbel. Nimmt man den Titer des Serums = T (also bei 200fachem Serum T = 200), den Verdünnungsfaktor des Serums = d (z. B. bei 1:50 d = 50); die Anzahl ccm Serum vom Titer T, die zur optimalen Flockung benötigt werden, $= n_T$; dann ist das Produkt $T \cdot n_T$ konstant = 924.

$$\text{da } 924 = \frac{2 \cdot 50}{0{,}108} = \frac{2 \cdot d}{L_f}$$

$$\text{ist demnach } T \cdot n_T = \frac{2 \cdot d}{L_f}$$

Rechnet man die Flockung nur auf 1 ccm Toxin anstatt auf 2 ccm und auf unverdünntes Serum (d = 1), dann ist

$$L_f \cdot T \cdot n_T = 1.$$

Diese Beziehung ergibt sich durch entsprechende Rechnung auch aus dem Verfahren von W. Scholz (Centralbl. f. Bakt. Abt. 1. Orig. Bd. 9. S. 72). Sie liegt jeder Flockung zwischen Diphtherietoxin und Antitoxin zugrunde.

Gelungene Umzüchtung des Staphylococcus aureus in Staphylococcus citreus.

[Aus der III. med. Klinik der kgl. ung. Universität in Budapest (Direktor: Prof. Baron A. v. Korányi).]

Von Dr. **Karl Hajós.**

Die nachfolgende Beobachtung söll einen Beitrag zur Frage der Staphylokokkeneinteilung bilden. Die Morphologie und Biologie der verschiedenen Staphylokokkentypen ist ein äußerst gründlich durchgearbeitetes Gebiet, auf welchem auch mit den heutigen Methoden nicht viel Neues zu bringen ist. Eigentlich können die Staphylokokken in zwei große Gruppen geteilt werden, und zwar in eine pathogene und in eine für den Menschen nicht pathogene Gruppe. Als Haupttypus für die pathogenen Kokken kann der Staphylococcus pyogenes aureus betrachtet werden.

Aus der Monographie von Neißer ist ersichtlich, daß der Aureus-Stamm unter Erhaltung seiner sonstigen Eigenschaften nicht in einen Albus-Stamm umgezüchtet werden kann, ebenso ist es nicht gelungen, einen Albus- oder Citreus-Stamm in einen Aureus-Stamm umzuzüchten. Staphylococcus aureus und citreus wurden also als selbständige Varietäten betrachtet. Es können die verschiedenen Varietäten in demselben Untersuchungsmaterial nebeneinander vorkommen, so daß bei der Annahme einer Umwandlung der verschiedenen Varietäten eine gewisse Vorsicht geboten ist.

Staphylococcus aureus und citreus besitzen bekanntlich ein lipochromes Pigment. Die Pigmente bieten außer der verschiedenen Farbe sonst keine auffallenden Unterschiede.

Das Pigment soll nach Beijerinck ein nutzloses Exkret sein; es wurden auch in einigen Untersuchungen keine besonderen Unterschiede zwischen dem Citreus- und Aureus-Pigmente gefunden. Die aus dem Brutschrank nach 24 Std. herausgenommenen Kulturen erscheinen pigmentlos; erst nachdem sie eine Zeitlang in diffusem Tageslicht standen, erzeugten sie den Farbstoff, was den von Beck und Schultz mitgeteilten Beobachtungen entspricht.

Die im folgenden mitgeteilte Beobachtung, daß ein Aureus-Stamm unter gewissen Bedingungen sich in einen Citreus-Stamm umwandelt, verdanke ich einem Zufall. Gelegentlich der Herstellung einer Autovakzine in einem Falle von Furunkulose wurde ein Staphylococcus pyogenes aureus gefunden. Die in physiolog. Kochsalzlösung aufgenommene Aureus-Kultur wurde in der von uns geübten Weise 1 Std. lang in ein 60° C heißes Wasserbad gestellt, um nach Ablauf dieser Zeit die 24stünd. Sterilitätsprobe vorzunehmen. Zufälligerweise ist die Temperatur des Wasserbades, infolge Aenderung des Gasdruckes in der Leitung, auf 50° C gesunken. Die vorgenommene Sterilitätsprobe zeigte, daß die Keime nicht abgestorben waren und daß einige Kolonien noch angingen. Nach mehrtägiger Beobachtung erwiesen sich diese Kolonien nicht als ursprüngliche Aureus-, sondern als Citreus-Kokken. Ich dachte an eine Mischkultur und nahm an, daß die Citreus-Kokken gegen Hitze weniger empfindlich wären. Ich ging wieder vom ursprünglichen Rasen aus, isolierte eine Aureus-Kolonie, aus welcher eine Schrägagarkultur in Kochsalzlösung aufgeschwemmt und im Wasserbade von 50° C 1 Std. lang erhitzt wurde. Aus dieser Aufschwemmung abgeimpft, blieben wieder einige Citreus-Kolonien zurück. Es mußte angenommen werden, daß infolge dieser Temperatureinwirkung die Citreus-Kolonien aus den Aureus-Kokken entstanden sind. Weitere Untersuchungen wurden angestellt, ob die 2 verschieden pigmentierten Kokken sich auch sonst verschieden verhielten:

Eine Nährbouillon von pH 6,9 erhielt nach der Beimpfung mit Aureus-Kokken eine pH 6,6, mit den aus diesen entstandenen Citreus-Kokken eine pH 6,7.

Die Staphylolysinbildung zeigte einen kleinen Unterschied, wie aus der Tabelle ersichtlich ist:

Verdünnungen	1:2	1:4	1:8	1:16
St. aureus	+	+	+	—
St. citreus	+	—	—	—

+ bedeutet Lösung der Kaninchenblutkörperchen. Aus fremden Aureus- und Citreus-Stämmen hergestellte Lysine verhielten sich etwas anders.

In einigen Meerschweinchenversuchen zeigte sich, daß dieselbe Menge Aureus-Kultur ein Tier tötet, welche als Citreus-Kultur ein gleich großes Tier nicht schädigt. Diese Versuche wurden wegen Tiermangels nicht weitergeführt. Doch haben sie den Beweis geliefert, daß die aus der Aureus-Kultur entstandenen Citreus-Kokken bezüglich der Hämolysinbildung und der Meerschweinchenpathogenität der Urkultur gegenüber sich schwächer verhalten.

Als weitere interessante Beobachtung möchte ich anführen, daß der Aureus-Rasen des obigen Stammes nach 10—15 Tagen kleine stecknadelkopfgroße Subkolonien bildet, welche ganz zitronengelb

sind (St. citreus), diese Citreus-Subkolonien weitergezüchtet, bilden einmal einen Citreus-, einmal einen Aureus-Rasen mit sich entwickelnden Citreus-Subkolonien; eine Regelmäßigkeit konnte aber nicht beobachtet werden.

Der beschriebene Stamm soll einen Beleg bilden dafür, daß unter noch nicht bekannten Umständen (Subkoloniebildung) Staphylococcus-Stämme sich ineinander umwandeln können und daß daher die Lehre von der Verschiedenheit der Staphylococcus-Varietäten bezweifelt werden kann.

Literatur.

Neißer (in Kolle-Wassermann) (Hdb. 2. Aufl. S. 355. — Beijerinck, zit. von Neißer. — Beck u. Schulz, Ztschr. f. Hyg. Bd. 23.

Die Vererbung der Wut durch die Plazenta[1]).

[Aus dem Odessaer Staatsbakteriologischen Institut und dem Poltawaer Pasteurinstitut.]

Von Dr. **Otto Herrmann,**

Chef des Pasteurinstituts in Poltawa.

Pasteur, Högyes, Zagari, Krokiewicz, Repetto u. a. Untersucher bestritten, daß die Wut durch die Plazenta vererbt werden könne, da jedoch heutzutage schon sehr viele positive Resultate zu verzeichnen sind (Perroncito u. Carità, Loir, Dammann u. Hasenkamp, Mießner, Kliem u. Kapfberger, Delaunay u. Huguier und besonders Konradi), so wird jetzt wohl schwerlich jemand noch die Möglichkeit der Vererbung der Wut bestreiten wollen.

Es ist jedoch immer noch nicht sicher feststehend, zu welchem Zeitpunkt der Uebergang des Virus von der Mutter auf das Kind erfolgt und ob und wie sich dabei das Lyssavirus verändert.

Konradi kam zu dem Ergebnis, daß das Virus im Blute der Mutter sogar noch vor der spezifischen Temperatursteigung zirkuliert und somit in den Fötus etliche Monate vor dem Tode der Mutter übergehen kann. Dabei soll das Virus beim Uebergang durch die Plazenta sich stets abschwächen, so daß bei den folgenden Passagen die Tollwut immer später und später ausbricht.

Bevor ich dieses näher bespreche, möchte ich zuerst über meine diesbezüglichen Erfahrungen berichten.

1. Serie. Kaninchen 5 wurde am 3. 12. 22 intramuskulär mit der Emulsion der Speicheldrüse einer an Hydrophobia gestorbenen Frau infiziert. Es erkrankte am 9. 3. 23 und erlag der Tollwut am 17. 3. 20 Tage vor dem Auftreten der ersten Symptome, also am 17. 2., warf sie 4 Junge, von denen eins am 19. 2. starb. Die 3 anderen dagegen blieben gesund, entwickelten sich sehr gut (sie wurden allwöchentlich

1) Nach einem Vortrage während der „VIII. Allrussischen Tagung der Bakteriologen, Epidemiologen u. Sanitätsärzte“ vom 20.—26. Mai 1924 in Leningrad (Petersburg).

gewogen) und hatten im Alter von 10 Mon. ein Gewicht von 1780, 2080 u. 2500 g. Ein Kaninchen wurde dann zu anderen Zwecken verbraucht und nach weiteren 2 Mon. wurde auch über die übrigen anderweitig verfügt.

Somit hat in diesem Falle die Mutter, welche 45—46 Tage nach der Infektion befruchtet wurde und 20 Tage vor dem Ausbruch der Krankheit Junge warf, letzteren die Wut weder durch die Plazenta noch durch die Milch übertragen.

2. Serie. Mit dem Gehirn eines Hundes, welcher ungefähr 10 Menschen gebissen hatte, wurden zwecks Untersuchungen etliche Tiere infiziert, darunter subdural zur Kontrolle Kaninchen 118 und Meerschweinchen 123. Ersteres erlag der Wut nach 18, letzteres nach 13 Tagen. Der Gebärmutter des Meerschweinchens wurde sofort eine halbentwickelte Frucht entnommen. Mit dem Gehirn des Fötus wurden intracerebral 3 Meerschweinchen infiziert. Eins starb am anderen Tage infolge der Operation, die anderen zwei dagegen (Nr. 124 und 126) gingen nach 8 und 11 Tagen an furiöser Wut zugrunde.

Mit dem Gehirn des Meerschweinchens 124 wurde subdural Kaninchen 138 und intracerebral Meerschweinchen 139 inokuliert. Ersteres erlag der Wut nach 13, letzteres nach 6 Tagen.

Tabelle I.

Wen	Infiziert			Erkrankt		Gestorben		Todesursache	Bemerkungen
	womit	wie	wann	wann	nach wieviel Tagen	wann	nach wieviel Tagen		
Kan. 118	Straßenvirus	subdural	15. XI.	29. XI.	14	3. XII.	18	Wut	
M. 123	„	intracer.	15. „	23. „	8	28. XI.	13	„	Der Gebärmutter ein Fötus entnommen
„ 124	Gehirn des Fötus von M. 123	„	29. „	5. XII.	6	7. XII.	8	„	furiöse Form
„ 126	dgl.	„	29. „	5. „	6	10. XII.	11	„	
„ 127	„	„	29. „	—	—	30. XI.	—	Operation	
Kan. 138	Gehirn des M. 124	subdural	15. XII.	26. XII.	11	28. XII.	13	Wut	Gehirn im Glyzerin gehalten
M. 139	dgl.	intracer.	15. „	20. „	5	21. „	6	„	

Aus dieser Serie ersehen wir, daß das Lyssavirus bei seinem Durchgang durch die Plazenta nicht schwächer, sondern stärker wurde und nach der ersten Passage schwächer war als nach der zweiten.

Obwohl Konradi gerade das Gegenteil zu beweisen sucht, so muß ich gestehen, daß seine eigenen Erfahrungen eine derartige definitive Schlußfolgerung nicht zulassen.

Aus seinen entsprechenden Arbeiten: Centralbl. f. Bakt. Bd. 38, Bd. 47 und Bd. 73 ersehe ich, daß das Virus bei den Jungen manchmal stärker war als bei den Muttertieren und nach der zweiten Passage stärker als nach der ersten, was in meiner 2. Tabelle ausführlich angegeben ist (Tab. II, S. 44).

Was die Zeit anbelangt, während welcher die Wut durch die Plazenta vererbt wird, so ergibt sich aus meiner zweiten Serie, daß zurzeit des Todes des Muttertieres an Tollwut der Embryo schon infiziert war.

Dammann u. Hasenkamp teilten mit, daß ein Kaninchen, welches während der ersten Symptome der Wutkrankheit 3 Junge geworfen hatte, auf diese das Virus durch die Plazenta bereits übertragen hatte.

Tabelle II.

In welcher Arbeit von Konradi angegeben		Womit infiziert	Welche Passage	Nach wieviel Tagen erlagen die Kaninchen?		Nach wieviel Tagen erlagen die Meerschw.?						Schlußfolgerung
Cbl. f. Bakt. Bd. 38	1. Serie	Gehirn des Fötus eines Meerschw.	1	105	475	91	92	96	98			Nach der 2. Passage wurde die Virulenz stärker
	1. „	dgl.	2	61	—	20	21	25	26	28	34	
	2. „	—	1	255	—							
		—	2	212	—							
Cbl. f. Bakt. Bd. 47	1. „	Gehirn eines Hundes	1	Nach 25 Tagen erkr., aber erholte sich wieder		21						Virus beim Fötus nicht schwächer, wie bei der Mutter
	1. „	Gehirn des Fötus desselben	1	Erkrankte später, starb aber		21						
Cbl. f. Bakt. Bd. 73	1. „	Gehirn des Fötus eines Kaninch.	1	Nicht erkrankt		28						Nach der 2. Passage wurde die Virulenz stärker
	1. „	Gehirn des Fötus eines Kaninch.	2	Spät erkrankt, starb aber		28						
	2. „	Gehirn eines Meerschweinchens	1	—		23	27					Virus bei d. Jungen stärker als bei der Mutter
	2. „	Gehirn der Jungen derselben	1	—		20	21					

Nach Delaunay u. Huguier kalbte eine Kuh 3 Tage bevor sie der Wut erlag. Das Kalb, welches nach der Geburt sofort isoliert wurde, ging dennoch nach etlichen Wochen an Wut zugrunde.

Auch die Experimente Konradis haben gezeigt, daß ein Teil der infizierten Versuchstiere das Virus während der Krankheit kurz vor dem Tode auf die Jungen überträgt. In einem Falle jedoch erwies sich die Wut vererbt 9 Tage vor der 1. Temperatursteigung (487 Tage vor dem Tode), im 2. Falle 11 Tage vor der Erkrankung und 12 Tage vor dem Tode und im 3. Falle 86 Tage vor dem Tode.

Wenn man letzteren Fall außer acht läßt, da nicht gesagt ist, ob die Temperatur täglich gemessen wurde, so kann man sagen, daß 9—11 Tage vor den ersten Symptomen, also dann, wann ungefähr der Speichel virulent wird, schon mit Wut infizierte Nachkommenschaft zur Welt kommen kann, dagegen solche, welche 20 Tage vor der Erkrankung der Mutter geboren werden (wie in unserem Falle), sich noch als ganz gesund erweisen können. Daraus könnte man vielleicht noch schließen, daß das Wutvirus, welches sich wahrscheinlich während der Inkubationszeit nicht im Blute befindet, in dasselbe kurz vor Ausbruch der Krankheit gelangt. Daß das Blut nicht nur lyssakranker Tiere, sondern auch lyssakranker Menschen virulent ist, habe ich gezeigt in meiner Arbeit „Die Ansteckungsfähigkeit des Blutes bei Lyssa humana" (vorgetragen während der „IV. Allukrainischen Tagung der Bakteriologen, Epidemiologen und Sanitätsärzte" vom 17. bis 20. April 1924 in Charkow).

Zusammenfassung.

1) Das Wutvirus, das durch die Plazenta übertragen wird, kann, wie üblich, bei den weiteren Passagen entweder schwächer oder stärker werden.

2) Das Wutvirus kann von der Mutter auf die Nachkommenschaft übertragen werden, wenn die Geburt während der Krankheit oder

9—11 Tage vor den ersten Symptomen erfolgt, dagegen können solche, welche 20 Tage vor dem Ausbruch der Wut geboren werden, noch ganz gesund sein.

3) Das Wutvirus gelangt wahrscheinlich in den Kreislauf des Blutes des infizierten Tieres kurz vor Beginn der ersten Symptome der Lyssa.

Literatur.

Babes, V., Traité de la rage. 1912. p. 274. — Dammann u. Hasenkamp, Ist die Wut vererbbar? (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 43. 1909. S. 697.) — Delaunay et Huguier, Contribution à l'étude de la rage conceptionnelle animale et naturelle. (Ref. Bull. de l'Inst. Pasteur. 1923. Nr. 7.) — Konradi, D., Ist die Wut vererbbar? (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 38. 1905. S. 60.) — Ders., Ist die Wut vererbbar? Ist das Blut Lyssakranker infektionsfähig? (Ibid. Abt. I. Orig. Bd. 47. 1908 S. 20.) — Ders., Die Vererbung der Wut. (Ibid. Abt. I. Orig. Bd. 73. 1914. S. 291.) — Loir, La rage dans l'Afrique du Sud. Ann. de l'Inst. Past. 1913. p. 298.) — Perroncito et Carita, Centralbl. f. Bakt. Bd. 1. 1887. S. 339.)

Geflügelspirochätose in Oesterreich.

II. Mitteilung.

[Aus der Station für Tierseuchendiagnostik a. d. staatlichen Tierimpfstoffgewinnungsanstalt in Mödling.]

Von Direktor Dr. **F. Gerlach.**

(Mit 2 Tafeln.

Ueber den gleichen Gegenstand habe ich bereits einmal in diesem Centralbl. Abt. I. Orig. Bd. 92. H. 1/2 Mitteilung gemacht. Seither hatte ich neuerlich Gelegenheit, Spirochätose des Geflügels in einer Reihe weiterer Bestände auf österreichischem Gebiete festzustellen. Es konnten daher die seinerzeit wegen Materialmangels unterbrochenen Untersuchungen über Geflügelspirochätose nun wieder fortgesetzt werden. In 2 Hühnerhöfen handelte es sich auch diesmal um Mischinfektionen von Spirochätose und Geflügelcholera.

Was den klinischen Ablauf der weiteren Spirochätosefälle betrifft, sind wesentlich neue, von den bereits mitgeteilten Wahrnehmungen sonderlich abweichende Beobachtungen nicht zu verzeichnen gewesen. Nur die kranken Tiere eines Geflügelhofes in K. zeigten im Endstadium der Erkrankung auffallend schwere Krampfanfälle, während welcher u. a. auch recht absonderliche und anhaltende Verdrehungen des Kopfes und Halses vollführt wurden (Tafel I, Fig. 1). Außerdem wurden diesmal Tiere jeden Alters, auch Kücken, von der Krankheit befallen. In sämtlichen Beständen verursachte die Erkrankung Massenverluste bis zu dem Augenblick, wo mit der Atoxylbehandlung eingesetzt wurde. Wie schon früher, konnte durch Injektionen von 0,04—0,05 g Atoxyl den Erkrankungen auf verläßliche Art ein Ende bereitet werden. Immerhin gingen beispielsweise in einem Geflügelbestande vor Anwendung

der Atoxylbehandlung 62, in einem anderen Hofe 20 Hühner an der Spirochätose zugrunde.

Die neuerdings bei dem an Spirochätose erkrankten und verendeten Geflügel erhobenen pathologisch-anatomischen Befunde zeigten weitgehende Uebereinstimmung mit den schon in der 1. Mitteilung beschriebenen, der Geflügelcholera oft ungemein ähnlichen Organveränderungen. Neben den fast ständig zu beobachtenden, in sehr verschiedenem Grade auftretenden herdförmigen Leberveränderungen (Tafel II, Fig. 2), den stets stark geschwollenen Milzen und der konstant nachweisbaren Nierenschwellung, waren zuweilen Katarrhe der Darmschleimhaut, entzündliche Veränderungen der Lungen und vereinzelt auch fibrinös-exsudaive Prozestse an den Serosen der Brust- und Bauchhöhlenorgane außergewöhnlich stark entwickelt. Besonders bei einem Huhn waren das Pericardium und die Leberserosa des linken Leberlappens in ihrer ganzen Ausdehnung von dicken, hellgelben Fibrinmembranen bedeckt (Tafel I, Fig. 3).

Ueber pathologisch-histologische Befunde bei der Geflügelspirochätose ist bisher nicht berichtet worden. Eine in Kürze erscheinende 3. Mitteilung über Geflügelspirochätose wird dieses Gebiet, das derzeit noch eingehend bearbeitet wird, zum Gegenstande haben.

Der Nachweis der Geflügelspirochäten gelang in Blutausstrichen auch diesmal leicht, selbst bei solchen Kadavern, die mehrere Tage eröffnet liegen geblieben waren. Am einfachsten und raschesten führt das Burrische Tuscheverfahren zur Sicherung der Diagnose, während sich verschiedene der gebräuchlichen Färbeverfahren für diesen Zweck durchaus nicht immer zuverlässig erweisen. Häufig gelingt die Färbung der Spirochäten mit Anilinfarbstoffen sehr schwer, und selbst die Giemsa-Färbung vermag sie mitunter auch bei 24stünd. Färbedauer nicht in der gewünschten Deutlichkeit zur Darstellung zu bringen. Dabei nehmen in vielen Fällen die Spirochäten sogar bei protrahierten Färbungen, auch bei Erwärmung der Farblösung, nur einen blassen Farbenton an, so daß sie bei der mikroskopischen Untersuchung schwer zu erkennen sind.

Gut bewährt hat sich bei der Geflügelspirochätose die von R. Griesbach in Nr. 4 der Münch. med. W. vom 25. 1. 1924 angegebene Methode der Spirochätenfärbung, mit der eine intensive Rotfärbung der Spirochäten in Ausstrichpräparaten nach folgender Vorschrift in kurzer Zeit mit Leichtigkeit erzielt wird: 1) Kurze Fixation über der Flamme. — 2) Mit einer 5proz. Kaliumpermanganatlösung lösung 3 Min. färben. — 3) Abspülen mit Wasser. — 4) Nachfärben mit Karbolfuchsin (1:10) 2 Min.

Ueber die Morphologie der Spirochaeta gallinarum s. anserina habe ich meiner 1. Beschreibung nichts hinzuzufügen. Die Suche nach den von Balfour beschriebenen endoglobulären Gebilden in den roten Vogelblutkörperchen, die als Entwicklungsstadien der Spirochäten gedeutet werden, blieb auch diesmal ergebnislos. Bei dem von mir wiederholt und eingehend daraufhin untersuchten Geflügel wurden solche Gebilde im Protoplasma der Erythrozyten weder während des Lebens in verschiedenen Krankheitsstadien, noch nach dem Tode der Tiere angetroffen. Auch in den roten Blutkörperchen von in Spontanheilung begriffenem oder von bereits spontan ausgeheiltem Geflügel wurden sie vermißt.

Des weiteren wurde auch der Versuch unternommen, die bei uns für

die Uebertragung der Spirochätose bestehenden Möglichkeiten näher zu prüfen. Vor allem wurde ein Augenmerk darauf gerichtet, ob das Geflügel in den mit Spirochätose infizierten Beständen von Ektoparasiten befallen war, die als Krankheitsüberträger in Betracht kommen könnten. Von Federlingen, die stets in m. o. w. zahlreichen Exemplaren bei allen Tieren vertreten waren, fanden sich die Arten Goniocotes, Goniodes, Lipeurus und Menopon stets reichlich, die aber mit den Erkrankungen in keinem ursächlichen Zusammenhang zu stehen scheinen. Argas-Zecken, die bekanntlich als natürliche Ueberträger der Spirochätose fungieren, waren niemals anzutreffen. Hingegen bin ich in der von mir bereits früher vertretenen Anschauung, daß Dermanyssus avium die Infektion zu vermitteln imstande sein dürfte, durch die weiteren Beobachtungen bestärkt worden. An dem gesamten, von mir diesbezüglich untersuchten spirochätosekranken Geflügel waren bisher jedesmal Vogelmilben (Dermanyssus gallinae s. avium) sehr zahlreich vertreten. In Quetschpräparaten von solchen mit dem Blut der infizierten Tiere vollgesogenen Milben war der Nachweis der Spirochäten nach dem Burrischen Tuscheverfahren unschwer zu erbringen, so daß ich schon einmal der Vermutung Ausdruck gegeben habe, daß an eine, wenn auch nur mechanische Uebertragung der Spirochätose durch Dermanyssus gedacht werden müsse. Um darüber einigermaßen Klarheit zu erlangen, wurde der nachstehend beschriebene Uebertragungsversuch durchgeführt:

In einem Käfige, der 2 Hühnern eben Raum zu bieten vermochte, wurden mittels einer Bretterwand 2 nur durch die schmalen Bretterfugen miteinander in Verbindung stehende Abteilungen geschaffen, von denen die eine zunächst mit einem künstlich infizierten und bereits schwer an Spirochätose erkrankten Huhn besetzt wurde. Zu diesem Huhn legte ich über Nacht Teile einer mit ungemein vielen Exemplaren von Dermanyssus besetzten Holzwand aus einem Hühnerstalle, in dem nachweisbar vollkommen gesundes Geflügel gehalten wurde. Am nächsten Tage, nachdem ein Großteil der Milben erwiesenermaßen mit spirochätenhaltigem Blute vollgesogen war, wurde ein seit längerem im Institute gehaltenes, gesundes und ungezieferfreies Huhn in die 2. Abteilung des Käfigs gebracht. 5 Tage später zeigte dieses Huhn klinisch deutlich ausgeprägte Symptome der Spirochätose (Schlafsucht, Durchfall) und gleichzeitig konnte bei der mikroskopischen Untersuchung des aus der Flügelvene entnommenen Blutes das Vorhandensein zahlreicher Spirochäten festgestellt werden. Die beiden Hühner sind späterhin von ihrer Erkrankung spontan genesen. Da die Versuchsanordnung so getroffen worden war, daß ein Kontakt zwischen den beiden Hühnern nur indirekt durch überkriechende Vogelmilben und sonst in keiner Weise vermittelt wurde, was von Wichtigkeit ist, da ich bereits mitgeteilt habe, daß im Kote des spirochätosekranken Geflügels gleichfalls Spirochäten enthalten sind, die gesundes Geflügel gelegentlich der Aufnahme des Futters vom Boden der Käfige oder sonstiger Unterkunftsräume per os zu infizieren vermögen, dürfte wohl der von mir vertretene Standpunkt gerechtfertigt sein, daß außer den bereits als natürliche Ueberträger der Geflügelspirochätose bekannten Zeckenarten (Argas, Ornithodorus) auch andere blutsaugende Ektoparasiten, bei uns vor allem die Vogelmilben (Dermanyssus avium) für die Uebertragung und Weiterverbreitung der Geflügelspirochätose verantwortlich zu machen sein dürften, wenn auch

mehrfache Bemühungen, diesen Versuch zu wiederholen, erfolglos geblieben sind. Dahingestellt bleibt vorderhand noch, wie ich schon seinerzeit erörtert habe, ob es sich dabei lediglich um eine mechanische Uebertragung der Spirochäten durch diese Ektoparasiten handelt, oder ob ihnen unter Umständen auch die Rolle eines echten Zwischenwirtes zukommt. In diesem Zusammenhange soll übrigens nicht unerwähnt bleiben, daß nach einer Mitteilung von Klee gelegentlich auch Geflügelcholera durch Vogelmilben übertragen werden kann. Beim Studium der Literatur finde ich nun auch eine kurze diesbezügliche Angabe in Kitts Lehrbuch der allgemeinen Pathologie. 4. Aufl. 1918. S. 118, wonach als Ueberträger von Spirosoma gallinarum Argas-Zecken und Vogelmilben (Arg. persicus und Dermanyssus) zu gelten haben.

So wie in den früheren Fällen, dürfte auch diesmal, wie aus den Angaben der Tierbesitzer hervorgeht, die Ursache von Neuausbrüchen der Geflügelspirochätose darin zu suchen sein, daß infiziertes Geflügel von umherziehenden Geflügelhändlern zugekauft oder eingetauscht wurde. In einem Bestande dürfte die Infektion auf enteralem Wege vermittelt worden sein, da die Spirochätose unter dem Geflügel rapid um sich griff, nachdem die Eingeweide eines neu angekauften und kurz hernach verendeten Huhnes in rohem Zustande verfüttert worden waren.

Ueber meine Versuche, bei Tauben eine künstliche Infektion zu setzen, ist ergänzend zu berichten, daß ich dabei bloß in einem einzigen Falle Erfolg hatte. Der betreffenden Taube, einem etwa einjährigen Tiere, waren 2 ccm einer dichten Aufschwemmung von Herzblut eines an Spirochätose verendeten Huhnes subkutan injiziert worden. Am 6. Tage zeigte sich die Taube offensichtlich krank. Sie verfiel in einen andauernden Schlafzustand und saß so mit stark gesträubtem Gefieder unbeweglich in ihrem Käfig. Diese Symptome einer schweren Erkrankung hielten in unverändertem Grade durch 48 Std. an. Während dieser Zeit wurden in dem durch Punktion aus der Flügelvene gewonnenen Blut Spirochäten in mäßiger Anzahl festgestellt. Am 8. Tage nach Vornahme der Infektion begann sich das Befinden der Taube allmählich zu bessern, die dann vom 12. Tage an, bei vollkommen negativem mikroskopischen Blutbefunde, wieder vollauf gesundete.

Auch die Kulturversuche mit Geflügelspirochäten wurden von mir neuerlich in Angriff genommen. Hierfür diente sowohl frisches Ausgangsmaterial, als auch das von Geflügelpassagen stammende Herzblut spirochätosekranker Hühner. Zur Anwendung gelangten die im Handbuch der mikrobiologischen Technik von Kraus und Uhlenhuth angeführten aëroben und anaëroben Verfahren zur Züchtung der Geflügelspirochäte nach Noguchi, Ungermann, Hata u. Levaditi, ferner die Kultur in Bouillon, Agar, Traubenzuckeragar mit und ohne Beigabe von Serum, in Gehirnbrei (nach E. v. Hibler) und in mannigfaltig kombinierten Nährböden.

Befriedigende Erfolge bei diesen Züchtungsversuchen hatte ich bisher nicht zu verzeichnen. Wohl ist mir eine Anreicherung der Spirochäten in primären Kulturen und eine bescheidene Vermehrung derselben in Subkulturen mehrmals gelungen, jedoch höchstens bis zur 3. Generation. Von da ab war eine Vermehrung der Spirochäten in den Subkulturen nicht mehr zu erzielen.

Die besten Erfolge lieferte die von Noguchi angegebene und von Hata verbesserte Methode der Kultur in gallertartigem Pferdeserum

mit Zusatz eines Stückchens der Speckschicht aus geronnenem Pferdeserum. Auch in Gehirnbrei, in welchem die Spirochäten eine relativ lange Lebensdauer aufwiesen, war die Anreicherung eine offensichtliche. Von den in der Literatur publizierten günstigen Erfolgen der Reinzüchtung der Geflügelspirochäte weichen meine Versuchsergebnisse allerdings ab. Hata z. B. gibt an, daß ihm die Kultur in dem von ihm verbesserten Noguchischen Nährboden durch 150 Tage in 27 Passagen gelungen sei. Zufolge meiner Beobachtungen gelingt es aber durchaus nicht leicht, auch bei Einhaltung bewährter Vorschriften, Reinkulturen der Geflügelspirochäte zu erzielen. Für diese Zwecke werden vorerst wohl noch geeignetere Züchtungsmethoden aufzufinden sein.

Den in verschiedenen Nährmedien und Aufschwemmungen suspendierten Geflügelspirochäten ist keine lange Lebensdauer beschieden. Bereits nach wenigen Tagen, in physiol. NaCl-Lösung aufgeschwemmt und im Kühlschrank verwahrt, mitunter schon nach 2 Tagen, geht ihre Pathogenität vollständig verloren.

So wie ich früher Gelegenheit hatte, zu beobachten, daß ein geringer Prozentsatz des bei uns an Spirochätose erkrankten Geflügels spontan ausheilt, konnte ich auch diesmal 8 Fälle schwerer Erkrankung verfolgen, die innerhalb 8—14 Tagen nach dem Auftreten der ersten Krankheitssymptome spontan zur Ausheilung gelangten. Es handelte sich dabei sowohl um natürlich erkrankte, als auch um künstlich infizierte Hühner. Bei den späterhin unter Zuziehung von Kontrolltieren vorgenommenen Reinfektionsversuchen erwiesen sich die von der Spirochätose genesenen Hühner nach Injektionen von Aufschwemmungen hochvirulenten Hühnerblutes in Dosen bis zu 10 ccm vollkommen immun. Sie zeigten bei negativ bleibendem Blutbefund keinerlei Krankheitserscheinungen. Wie schon eingangs erwähnt, waren im Blute dieser genesenen Tiere keine Gebilde nachweisbar, die als Dauerformen der Spirochäten hätten gedeutet werden können. Das zu verschiedenen Zeitabschnitten von den spontan ausgeheilten auf gesunde Hühner überimpfte Blut vermochte keineswegs zu infizieren.

Zusammenfassung.

Seit ungefähr 1 Jahre, als ich zum 1. Male das Vorkommen der Geflügelspirochätose in Oesterreich feststellen konnte, wurde diese Erkrankung verhältnismäßig häufig in Geflügelbeständen verschiedener Gebiete des Landes angetroffen. Nach Veröffentlichung meiner 1. Mitteilung sind auch an der Tierärztlichen Hochschule in Wien mehrmals Fälle von Spirochätose des Geflügels aus Beständen von Wien und Umgebung ermittelt worden. Wir sind daher zu der Erkenntnis gekommen, daß die Geflügelspirochätose gegenwärtig in einem nicht unerheblichen Maße auch in Oesterreich heimisch ist. Daß diese Erkrankung hier früher niemals festgestellt wurde, könnte seinen Grund darin haben, daß die Spirochätose vielleicht erst in der Nachkriegszeit eingeschleppt wurde, oder, was viel wahrscheinlicher ist, daß bei den für die Diagnose der Geflügelkrankheiten gebräuchlichen Färbungen von Ausstrichpräparaten, die sich für die Darstellung der Spirochäten nicht oder nur schlecht eignen, die bestenfalls nur mangelhaft tingierten Spirochäten übersehen worden sind. Vielfach und auch neuestens

noch lautete die Diagnose der intervenierenden Tierärzte auf Geflügelcholera, die oft erst verspätet berichtigt werden konnte, wenn nach erfolglosen Serumimpfungen Kadaver des gefallenen Geflügels zur Diagnosestellung eingesandt wurden. Die Atoxylbehandlung hat sich für die Bekämpfung der Spirochätose bisher stets durchaus verläßlich erwiesen.

Befallen werden von der Spirochätose Tiere aller Altersstufen. Die Diagnose kann unschwer durch den Nachweis der Spirochäten im Blute, sowohl intra vitam als auch längere Zeit nach dem Tode erbracht werden. Für diagnostische Zwecke zu empfehlen ist die besonders einfach zu handhabende und binnen weniger Min. zum Ziele führende Herstellung von Tuschepräparaten, ebenso wie die von Griesbach angegebene Färbung mit Kaliumpermanganat und Karbolfuchsin. Die bei der Spirochätose zu ermittelnden pathologisch-anatomischen Befunde sind in meiner 1. Mitteilung angeführt worden, wobei auch auf deren Aehnlichkeit mit den für Geflügelcholera typischen krankhaften Veränderungen hingewiesen wurde.

Bei der Geflügelspirochätose finden sich neben einem konstant vorhandenen Milztumor und der stets anzutreffenden Schwellung der Nieren ungemein häufig kleinste punktförmige bis flächenhafte, hellgelbe oder graugelbe Herde in der degenerierten Leber, mitunter katarrhalische Affektionen der Darmschleimhaut, zuweilen entzündliche Lungenveränderungen und hie und da auch serofibrinös-exsudative Prozesse an den Serosen der Brust- und Bauchhöhlenorgane.

Endoglobuläre Gebilde in den roten Blutkörperchen, wie sie von Balfour beschrieben worden sind und die als Entwicklungsstadien der Spirochäten gedeutet wurden, waren weder bei krankem, noch bei verendetem, noch auch bei spontan ausgeheiltem Geflügel aufzufinden.

Bei der Untersuchung des mit Spirochätose infizierten Geflügels auf Ektoparasiten wurden Argas-Zecken niemals angetroffen, wohl aber in jedem Falle m. o. w. zahlreiche Exemplare von Dermanyssus avium. Eine Bestätigung für die bereits früher geäußerte Vermutung, daß die Vogelmilben als Ueberträger der Spirochätose in Betracht zu ziehen seien, konnte dadurch erbracht werden, daß es gelungen ist, ein gesundes Huhn durch Besetzen mit Vogelmilben, die mit dem Blute eines spirochätosekranken Huhnes vollgesogen waren, erfolgreich zu infizieren. Ob Dermanyssus avium außer für eine mechanische Uebertragung der Spirochätose auch als echter Zwischenwirt in Betracht kommt, bleibt aber auch fürderhin noch dahingestellt. Unter Bedachtnahme auf die Möglichkeit einer Uebertragung etwaiger Infektionen erscheint es jedenfalls dringend geboten, der Bekämpfung des Ungeziefers in den Geflügelbeständen ein erhöhtes Augenmerk zuzuwenden. Die Einschleppung der Geflügelspirochätose in die Geflügelbestände erfolgte durch Ankauf oder Tausch von Geflügel bei

herumziehenden Händlern, in einem Falle durch Verfütterung der rohen Eingeweide eines verendeten, neu zugekauften Huhnes.

Kulturversuche mit Geflügelspirochäten hatten nicht den gewünschten Erfolg. In künstlichen Nährmedien und in physiologischer NaCl-Lösung ging die Pathogenität der Spirochäten innerhalb weniger Tage verloren.

Spontanheilung erkrankten Geflügels war des öfteren zu beobachten. Solche Tiere wiesen gelegentlich späterer Reinfektionsversuche stets einen hohen Grad von Immunität auf.

Erklärung der Tafelabbildungen.

Fig. 1. Spirochätose, Huhn. Krampfanfall im Endstadium der Erkrankung.
Fig. 2. Herdförmige Leberveränderungen verschiedener Größe bei Geflügelspirochätose.
Fig. 3. Spirochätose, Huhn. *F* = Fibrinmembran über dem linken Leberlappen.

Epizootie und Prophylaxis der Piroplasmose der Pferde, hervorgerufen von Babesia caballi.

Von Prof. **A. Belitzer** (Rjasan, Rußland).

Im europäischen Rußland werden 2 Arten von Piroplasmose der Pferde beobachtet: Erreger der einen ist Babesia caballi, deren Ueberträger die Zecke Dermacentor reticulatus ist, während Erreger der 2. Art die Nuttallia equi ist und deren wahrscheinlicher Ueberträger die Zecke Hyalomma aegypticum.

Die 1. Art der Piroplasmose der Pferde ist in den Gouvernements Mittelrußlands und des Südens verbreitet, während die 2. nur in den Gouvernements des Südens vorkommt. Im Norden wird aber keine Piroplasmose beobachtet.

Hier wollen wir die Ergebnisse unserer fast 20jährigen, im Gouvernement von Rjasan angestellten Beobachtungen und Experimente über die durch Babesia caballi verursachte Piroplasmose der Pferde mitteilen.

Die Piroplasmose wird nur in bestimmten Dörfern beobachtet, deren Weideplätze auf waldigem oder sumpfigem Boden liegen und hat durchaus den Charakter einer Saisonkrankheit. Epizootisch tritt sie nur im Mai und Anfang Juni auf, in Form einzelner Erkrankungen aber im September und Oktober, der Periode der Entwicklung und Reife des Dermacentor reticulatus. Ihre Larven und Nymphen verbreiten die Ansteckung nicht.

Die Metamorphose des Dermacentor reticulatus verläuft in Mittelrußland in folgender Weise: Die Zecke überlebt den Winter im reifen Zustande und befällt im Frühjahr noch während der Fröste (April und Mai) die Tiere. Das Weibchen legt Eier. Larven -und Nymphenstadium durchlebt die Zecke in den Sommermonaten augenscheinlich als Parasit kleiner Nager oder ähnlicher Tiere. Im Herbste erscheinen dann wieder reife Zecken, die aber keine besondere Aktivität zeigen und Großvieh nur in höchst geringer Anzahl befallen.

Die Piroplasmose der Pferde, die hier „Mai- oder Frühlingskrankkrankheit" genannt wird, ist schon lange Zeit, und zwar schon vor

der Feststellung ihrer Aetiologie 1906, bekannt und verschieden gedeutet worden. Sie ist von großer ökonomischer Bedeutung, denn in den Dörfern, wo sie herrscht, gehen oft Hunderte von Pferden ein. Der Verlust des Staates beträgt jährlich mehr als Zehntausende von Pferden.

Die Sterblichkeit der erkrankten Tiere schwankt, was von vielen Ursachen abhängt; im Durchschnitt beträgt sie 30—40 Proz. Der Verlust an Tieren wird noch dadurch erhöht, daß bereits erkrankte Pferde in der Inkubationsperiode noch zur Arbeit benutzt werden. Während der schweren Arbeit, als solche ist das Ackern im Frühling anzusehen, beträgt die Sterblichkeit der erkrankten Tiere fast 100 Proz. Die Piroplasmose wird von erschöpften, alten Pferden und trächtigen Stuten nur schwer überstanden.

Schon bevor die Natur der Krankheit bekannt war, stand es fest, daß nur diejenigen Pferde zur „Frühlingskrankheit" neigten, welche aus anderen günstigen Gegenden eingeführt worden waren, die einheimischen aber nicht, ebensowenig die vorher krank gewesenen, zum zweiten Male. Infolgedessen sind an ungesunden Orten die einheimischen Pferde sowie die von auswärts eingeführten, die schon die Krankheit überstanden haben, um 10—20 Proz. teurer als die frisch eingebrachten, aber noch nicht krank gewesenen.

Untersuchungen dieser Krankheit ergaben, daß alle Pferde für die Piroplasmose empfänglich sind. Die Pferde aus ungesunden Gegenden werden nicht immun, sondern gewöhnlich gleich in ihrem 1. Lebensjahre davon angesteckt. Ihr Leiden verläuft aber leicht und unbemerkbar, dank ihrer Jugend und Untätigkeit. Ueberstandene Piroplasmose macht die Pferde auf längere Zeit widerstandsfähig gegen neue Infektion.

Die Widerstandsfähigkeit wiederholter Infektion gegenüber ist, wie auch bei anderen Piroplasmosen, von einem virulenten Zustande des Blutes der krank gewesenen Tiere begleitet.

Bei unseren Studien über die „Immunität" bei der Pferdepiroplasmose (Babesia caballi) konnten wir folgendes feststellen:

Im Laufe der Krankheit ist bei Vorhandensein von Parasiten im Blute letzteres für empfängliche Tiere ansteckend.

Das Blut krank gewesener Pferde, in welchem bei der gewöhnlichen mikroskopischen Untersuchung keine Parasiten festzustellen waren, besitzt auch virulente Eigenschaften, die bei Laboratoriumsversuchen bei einem künstlich angesteckten Pferde im Blute über $2^1/_2$ Jahre nachweisbar waren. Jedenfalls ist anzunehmen, daß die Virulenz des Blutes über 1 Jahr vorhält.

Mitunter ist festgestellt, daß das Präparat Trypanblau, welches vorzügliche Resultate beim Behandeln der Piroplasmose der Pferde, wie bei laboratorischen Experimenten, so auch in der gewöhnlichen Praxis gibt, in therapeutischen Dosen aber angewandt, keine Sterilität des Pferdeorganismus erzeugt.

Das Blut „einheimischer" Pferde aus ungesunden Gegenden, welche bei ihren Besitzern als nie krank gewesen galten, rief bei Impfung empfänglicher Tiere Ansteckung hervor, was auch auf vorangegangene Infektion schließen läßt.

Laboratoriumsuntersuchungen sowie Beobachtungen an Orten der Epizootie zeigen, daß die Unempfänglichkeit für wiederholte Piroplasmoseansteckung nicht nur begleitet, sondern auch abhängig ist vom virulenten Zustande des Blutes. Das Versuchspferd, dessen Blut nicht mehr virulent war, erkrankte bei wiederholter Ansteckung von

neuem an Piroplasmose. „Einheimische“ Pferde aus ungesunden Gegenden, welche eine Reihe von Jahren nicht mehr auf infizierten Weideplätzen gewesen waren, erkrankten wie die aus gesunden Gegenden eingeführten.

Die beständige, während des ganzen Lebens dauernde Immunität der Pferde in ungesunden Gegenden erklärt sich dadurch, daß diese Pferde, nachdem sie im jugendlichen Alter die Krankheit überstanden und dadurch das Blut infiziert hatten, diesen Zustand alljährlich durch eine natürliche Reinfektion beim Aufenthalt auf infizierten Weideplätzen halten. Vom praktischen Standpunkt aus müssen diese wiederholten Ansteckungen als eine automatische „Revakzination“ angesehen werden.

Die theoretische Erklärung des Immunitätszustandes bei wiederholten Ansteckungen der erwähnten Krankheit wollen wir hier nicht behandeln, sondern diese Erscheinung vom Veterinär- und vom rein ökonomischen Standpunkte aus betrachten.

Alle Pferde aus den von Piroplasmose heimgesuchten Gegenden, die im Frühling auf der Weide grasen, sind heimliche Träger der Piroplasmoseinfektion. In jedem Gouvernement werden deren Zehntausende gezähllt. Da diese Pferde bei ihrem Umhertreiben keinen veterinärhygienischen Vorschriften unterworfen sind, können sie auf natürlichen Wegen die Infektion überall verbreiten, wo der Dermacentor reticulatus haust. In dieser Hinsicht unterscheidet sich die Pferdepiroplasmose von vielen Arten der Piroplasmose bei anderen Tieren nicht.

Indes bleibt die Krankheit trotz des Fehlens der Schutzmaßnahmen auf gewisse Orte beschränkt. In der Regel werden keine Fälle von Ansteckung selbst in den benachbarten Dörfern beobachtet, deren Weideplätze einen anderen Charakter als die verseuchten tragen, und wohin nicht nur schon krank gewesene Pferde, sondern auch unmittelbar mit infiziertem Blute vollgesogene Zeckenweibchen gelangen. Sogar bei Ausbruch des Welt- und Bürgerkrieges, als die Pferde an die verschiedensten Orte innerhalb des Reiches und auch nach außerhalb hin und her geworfen wurden, was stets die Verschleppung zahlreicher anderer Epizootien zur Folge hat, entstanden keine neuen Piroplasmaherde der Pferde in günstigen Gegenden Rußlands und anderer Länder. Dieses kolossale Experiment zeigt, daß Piroplasmose der Pferde eine Krankheit ist, welche keine Tendenz hat, sich von ihrem Herde aus zu verbreiten. Diese Tatsache hat ihren Grund darin, daß der aktive Ueberträger der Krankheit, die Zecke, mit gewissen, uns noch unbekannten örtlichen Verhältnissen eng verbunden ist und nur in gewissen Bezirken gedeihen kann.

Schutzmaßnahmen für Pferde, die als Piroplasmoseträger anzusehen sind, lassen sich aus ökonomischen Gründen nicht durchführen, sie sind auch in der Tat nicht dringend notwendig. Um der Verbreitung der Piroplasmoseinfektion vorzubeugen, muß die Aufmerksamkeit der Tierärzte auf die Zecke gerichtet sein.

Wie wirkt nun die überstandene Piroplasmose auf den Organismus der Tiere ein, und welche Folgen bringen diese Erkrankungen vom wirtschaftlichen Standpunkte aus mit sich? Im Verhältnis zu der Schwere des Krankheitsprozesses erholen sich die Pferde relativ schnell; die Rekonvaleszenz dauert im allgemeinen nur 1—3 Wochen. Nach dieser Zeit sind die Tiere vollständig gesund und unterscheiden sich in nichts von den nie krank gewesenen Pferden.

Rezidive werden weder bei einheimischen Pferden der Piroplas-

mosegegenden noch bei solchen Pferden, die aus anderen Gegenden stammen und die Krankheit schon überstanden haben, beobachtet, obwohl die Tiere Träger der Piroplasmoseinfektion sind. Diese Tatsache ist erhärtet durch überaus zahlreiche Beobachtungen. Pferde, welche die Krankheit überstanden haben, äußern keinerlei Krankheitssymptome: sie sind normal bei der Arbeit, haben normale Nachkommenschaft, sind wohlgenährt usw. In den Piroplasmosegegenden zeigen die Erkrankungen keinen besonders schweren Verlauf und keine besonderen Komplikationen (wie Pleuropneumonie u. a.). Hierfür haben die Erfahrungen aus dem letzten Kriege zahlreiche Beweise geliefert; es hat damals eine große Zahl von Pferden aus Piroplasmosegegenden für Heereszwecke Verwendung gefunden; diese Tiere waren allen möglichen ungünstigen Einwirkungen ausgesetzt, hatten mannigfache Infektionskrankheiten zu überstehen und unterschieden sich trotzdem in gar nichts von den anderen Pferden.

Wie wir oben bemerkten, halten die Einwohner der Piroplasmosegegenden ihre selbst gezogenen sowie auch die hereingebrachten und schon krank gewesenen Pferde in keiner Hinsicht für schlechter, sondern im Gegenteil für wertvoller als die anderen, d. h. ihre Umwandlung in Infektionsträger gilt aus wirtschaftlichen Gründen als ein Vorzug. Und darin hat man recht.

Hieraus ergibt sich für die Prophylaxe der Pferdepiroplasmose folgendes: da es in Piroplasmosegegenden unmöglich ist, ein Pferd vor der Ansteckung zu schützen (außerhalb der Weideplätze können die Pferde Zecken beim Pflügen neben Wald und Büschen oder auch beim Fahren durch Wald aufnehmen) und da ferner die überstandene Krankheit keine nachteiligen Folgen hinterläßt, so ist es geradezu geboten, die Pferde erkranken zu lassen, unter der Voraussetzung natürlich, daß hierbei möglichst geringe Verluste eintreten. Es ist daher ratsam, „einheimische“ Pferde gleich in ihrem ersten Lebensjahr einer natürlichen Infektion anzusetzen und sie dann alljährlich für einige Tage im Frühjahr auf infizierten Weideplätzen zur „Revakzination“ weiden zu lassen.

Es ist zweckmäßig, in günstiger Gegend ein junges, noch arbeitsunfähiges Pferd anzukaufen, da es in diesem Alter die Piroplasmoseinfektion leichter übersteht. Damit ein erwachsenes, von auswärts hereingebrachtes Pferd die Piroplasmose besser übersteht, muß ihm vollständige Befreiung von jeglicher Arbeit, entsprechendes Futter, Ruhe und Pflege von dem Moment an geboten werden, wo es von den Zecken befallen wird, und zwar bis zur vollständigen Genesung. Nach der Krankheit müssen auswärtige Pferde gleich den einheimischen jedes Jahr im Frühling auf infizierten Feldern weiden.

Die Möglichkeit, durch natürliche Erkrankung das für Piroplasmose empfängliche Tier gegen künftige Ansteckungen zu schützen, legt den Gedanken nahe, künstliche Ansteckung zu prophylaktischen Zwecken zu versuchen. In der Tat wäre es von großem Vorteil, wenn die in Piroplasmosegegenden unvermeidliche Erkrankung der Pferde auf eine günstigere Zeit, als es die Frühlingsarbeitszeit (Ackerbau) darstellt, verlegt werden könnte, denn Ruhe während der Zeit der Inkubation und während der Erkrankung ist eine Voraussetzung für eine geringe Sterblichkeit der Tiere. Die Befreiung der Pferde von der Arbeit ist im Herbst in der Wirtschaft vorteilhafter als im Frühling; die

Wahl der zur Erkrankung zu bestimmenden Zeit je nach dem Wunsche des Besitzers hätte naturgemäß große Vorteile.

Da jedoch die natürliche Ansteckung durch die Zecken auf den Weideplätzen nur im Frühling möglich ist, gerade wenn das Pferd am unentbehrlichsten bei der Arbeit ist, so entsteht die Frage, ob die natürliche Ansteckung nicht durch eine künstliche, d. h. durch Impfen mit virulentem Blut ersetzt werden kann.

Laboratoriumsbeobachtungen über Dutzende von Pferden, die zu verschiedenen Zwecken mit Piroplasmoseblut infiziert wurden, zeigten, daß die Impfung mit virulentem Blut bei Pferden eine Piroplasmoseerkrankung hervorruft, die minder schwer ist als diejenige, welche die infizierten Zecken verursachen.

Es erwies sich, daß es unter experimentell infizierten Pferden keine Sterblichkeit gab. Am leichtesten sind die Erkrankungen, die durch Verimpfen von Blut eines Pferdes hervorgerufen werden, das seine Krankheit bereits völlig überstanden hat, und in dessen Blute bei gewöhnlicher mikroskopischer Untersuchung Parasiten sich nicht mehr nachweisen lassen. Je entfernter der Moment der Entnahme des Impfblutes vom Höhepunkt der Piroplasmosekrankheit des „Blutspenders" ist, desto leichter verläuft die Krankheit des infizierten Tieres.

Die Inkubationsperiode bei den auf diese Weise infizierten Pferden ist bedeutend länger, als bei der natürlichen Infizierung. Das Fieber hält zwar bisweilen ebenso lange an, zeigt aber stärkere Remissionen und ist im allgemeinen schwächer.

Alle anderen Krankheitserscheinungen sind viel milder; Parasiten werden im Blute in so geringer Anzahl beobachtet, daß es in vielen Fällen nur mit großer Mühe gelingt, sie erst ganz gegen Ende der Krankheit nachzuweisen.

Aus diesem Grunde ist die Infektion mit virulentem Blut krank gewesener Pferde nicht als eine einfache Infektion zu betrachten, sondern als Vakzination, d. h. als Impfung mit einem gewissermaßen abgeschwächten Virus.

Die Tatsache ist, daß die Virulenz des im Organismus des krank gewesenen Pferdes vorhandenen Parasiten allmählich abnimmt, ist aus folgenden Gründen verständlich:

Für die normale Entwicklung der Piroplasmosen ist der Organismus zweier Wirte erforderlich, der Zecke und des Pferdes. Da die Parasiten im Körper des Pferdes sich nicht auf geschlechtlichem Wege vermehren können, so müssen sie allmählich zugrundegehen, denn zu seiner weiteren Lebenserhaltung ist geschlechtliche Entwicklung im Zwischenwirt erforderlich. Befinden sich die Parasiten bereits lange Zeit im Körper des Pferdes, so werden sie weniger infektionstüchtig, schwächer und gehen schließlich zugrunde.

Als besondere Bestätigung dieses Gedankens ist die Tatsache der totalen Avirulenz des Blutes bei dem Hornvieh bei Theileria parva anzusehen.

Es ist bekannt, daß das Blut der an dieser Art der Piroplasmose erkrankten Tiere, das eine große Anzahl von Parasiten enthält, nicht die Eigenschaft besitzt, durch direkte Verimpfung Ansteckung hervorzurufen, während dasselbe Blut die Zecken infiziert und die Parasiten in dem Organismus der Zecken ihre virulenten Eigenschaften für das Hornvieh wiedererwerben.

Das bestätigt auch die von Theiler festgestellte Tatsache der

Schwächung des Virus bei Weiterzüchtung des Parasiten im Organismus empfänglicher Tiere, im Gegensatz zu der Bakterieninfektion.

Nach einer Reihe von speziellen Laboratoriumsuntersuchungen wurden von uns Immunisierungsversuche an Pferden von Privatbesitzern zu praktischen Zwecken gemacht. Von 1912 bis jetzt wurden von uns ca. 200 Pferde immunisiert, und zwar mit den günstigsten Resultaten sowohl was die Reaktion auf die Impfung, als auch was die spätere Standhaftigkeit gegen Ansteckung auf infizierten Weiden anbetrifft. Als prophylaktische Maßregel ist die Impfung gegen Pferdepiroplasmose in höchstem Grade von Nutzen, abgesehen von ihrer Unvollkommenheit.

Wenn man in Betracht zieht, daß an Piroplasmosearten alle einheimischen Pferde als Träger der Piroplasmoseansteckung anzusehen sind, und daß jedes hereingebrachte Pferd unumgänglich angesteckt wird und infolgedessen entweder verenden oder selber zum Träger der Infektion werden muß, so ist es klar, daß durch künstliche Ansteckung der nie krank gewesenen Pferde wir die Zahl der Infektionsüberträger nicht vergrößern, sondern die natürliche Ansteckung nur durch eine schwächere künstliche ersetzen. Daher muß das Impfen der Piroplasmose in solchen Gegenden aus sanitären Gründen als wünschenswert zugelassen werden.

Als Material für die prophylaktischen Impfungen dient das Blut eines Pferdes, das mindestens vor 3 Monaten eine Infektion überstanden hat (zweite Passage). Es kann auch von einem Pferde, welches auf natürlichem Wege erkrankt gewesen, Gebrauch gemacht werden. Das „Blutpferd" muß möglichst jung und sonst gesund sein. Die Dose des Blutes bei Perkutaninjektion beträgt 5—10 ccm.

Alte (12—15jährige) erschöpfte Pferde mit Herzfehlern und trächtige Stuten, von der zweiten Periode an, werden zum Impfen nicht zugelassen.

Geimpfte Pferde müssen gute Pflege und gutes Futter erhalten und sind von jeglicher Arbeit für 5—6 Wochen zu befreien (die Inkubationsperiode beträgt 15—25 Tage, die Reaktion 7—12 Tage und Ruhe 7—10 Tage).

Pferde, welche die prophylaktische Impfung überstanden haben, müssen mit den übrigen einheimischen Pferden alljährlich auf infizierte Weideplätze geführt werden zur künstlichen „Revaccination".

1922—23 wurde meine Methode der Schutzimpfung gegen Pferdepiroplasmose von einer Kommission kontrolliert, die aus Prof. K. I. Skrjabin, Prof. N. A. Michin und dem Veterinärarzt A. G. Schilin bestand, und die bestätigte:

1) daß das Impfen bei den Pferden nur eine verhältnismäßig leichte Erkrankung hervorruft, 2) daß das Impfen ihnen Schutz gegen natürliche Ansteckung verleiht, — 3) daß es keine unerwünschte Folgen für den Gesundheitszustand und die Arbeitsfähigkeit der Pferde nach sich zieht, — 4) daß das Impfen eine rationelle prophylaktische Maßregel für solche ungünstig gelegenen Dörfer ist, in denen es keine andere Möglichkeit gibt, der Piroplasmoseansteckung der Pferde auf andere Weise vorzubeugen.

Demnächst sollen Impfungen in größerem Maßstabe zur Ausführung gelangen.

Additional Notes on the Acanthocephala from America described by J. E. Kaiser [1893][1].

By **H. J. Van Cleave,** Urbana (Illinois).

With 5 figures.

In 1893, J. E. Kaiser described 3 species of Acanthocephala from specimens collected in Florida, but he was unable to furnish any data concerning the hosts from which they came. These species have been objects of conjecture on the part of systematists who from time to time have attempted to determine their generic and specific relationships. Thus, de Marval (1905) lists Echinorhynchus trichocephalus Leuckart (in Kaiser) and Echinorhynchus uncinatus Kaiser as synonyms of the European species Echinorhynchus frassoni Molin. Lühe has more recently made this last mentioned species the type of his genus Arhythmorhynchus (1911). Both Lühe (1912) and the present writer (Van Cleave, 1916) have maintained that E. trichocephalus and E. uncinatus are valid species of the genus Arhythmorhynchus, but knowledge of some of the morphological details for these 2 species has been lacking and thus a thorough-going comparison with and differentiation from other members of the genus have been impossible.

In his discussion of E. uncinatus, de Marval assumed that Kaiser had simply failed to observe the immense ventral hooks upon the proboscis when as a matter of fact Kaiser definitely stated that such hooks are not present and gave accurate measurements of the hooks which occupy this position upon the proboscis. This assumption, based wholly upon a subjective opinion, was entirely unwarranted as I have been able to demonstrate after an examination of the type specimens.

The third species, Echinorhynchus spinosus Kaiser, has been unrecognized until recently, due to an error on the part of Kaiser in that he incorrectly named the basal region of the proboscis and called it a neck. In a paper now in press, I have presented the evidence which tends to prove that Centrorhynchus spinosus Van Cleave is identical with Echinorhynchus spinosus Kaiser and consequently by a peculiar coincidence Centrorhynchus spinosus Van Cleave, 1916, becomes an exact synonym of Centrorhynchus spinosus (Kaiser, 1893). With the recognition of this identity, one of the problems concerning Kaiser's little known species from North America has been solved for the species involved has come to be known from various hosts among the North American birds.

Until the present time, Kaiser's drawings and careful but incomplete descriptions of Arhythmorhynchus trichocephalus and A. uncinatus have been the only source of information available regarding either of these species for if either species has been discovered by subsequent collectors there is no published record of the discovery.

Through the courtesy of Doctor Georg Grimpe of the Zoological Museum of Leipzig, I have had the opportunity of studying the

1) Contributions from the Zoological Laboratory of the University of Illinois, No. 253.

cotypes of Arhythmorhynchus uncinatus. I wish here to express my sincere appreciation of the ready and courteous response with which my request for the material was met. Unfortunately, the type specimens of Arhythmorhynchus trichocephalus and Centrorhynchus spinosus are not available for reexamination. However, among the specimens which Doctor Grimpe sent from the Leipzig Museum there was a vial which, according to the label, contained specimens supposed to be the juvenile forms of „E. uncinatus". Upon examining these, I found that they agree in great detail with the data presented for E. trichocephalus in Kaiser's Monograph. The label also bore the information that they were taken by „Gerhard" to whom the discovery of the types of A. uncinatus is accredited. This fact makes it seem highly probable that the immature specimens of A. trichocephalus incorrectly identified as „E. uncinatus" are from the same expedition and probably from the same locality as the types of A. trichocephalus though their immature condition precludes the possibility of their being the actual type specimens. While the individuals are not sexually mature and therefore fail to come up to the bodily dimensions recorded by Kaiser for Arh. trichocephalus, the data which Kaiser has given for the proboscis and its hooks are in complete agreement with observations which I have made upon the specimens received from Leipzig.

This opportunity of examining specimens of both A. uncinatus (Kaiser) and A. trichocephalus (Leuckart, in Kaiser) has made it possible to add further information to that given in the original descriptions. By this increase in knowledge of morphological details the 2 species are more readily differentiated from the other representatives of the genus.

Arhythmorhynchus uncinatus (Kaiser, 1893).

Body of sexually mature individuals 40 to 60 mm long, with a long ovoid swelling 1 to 1,3 mm in diameter about 5 mm back from the neck. Anterior to this a smaller cylindrical region which at its anterior extremity bears a short swollen region about 1 to 1,4 mm long and 1,7 to 2 mm in diameter. Upon the anterior body enlargement are borne the cuticular spines characteristic of the genus. Long posterior tail-like region 1 to 1,2 mm. in diameter. Spindle-shaped proboscis 1,2 to 1.5 mm long with a diameter of 0,34 mm in the thickest part and 0,24 mm in the anterior region. Proboscis hooks in 18 longitudinal rows of 16 to 18 each, with no conspicuous size differentiation of the hooks upon the ventral surface as contrasted with those of the dorsal. Longest hooks about 110 μ except some of the spine-like hooks on the basal region of the proboscis which are about 120 μ long. Hooks of anterior and posterior regions of proboscis of 2 distinctly different types. On the anterior region they are relatively heavy, strongly recurved hooks with a single, heavy, reflexed root while on the basal region they are simple, thorn-like, without reflexed roots. In the region of transition between the hooks of these 2 types, a few hooks of a third variety are found. These are heavy, claw-like hooks only about 40 μ long.

Embryos from the body cavity of one of the cotypes are 56 to 65 μ long and 27 to 35 μ in diameter. The cotypes of this species are from an unknown host collected by Gerhard in Florida.

Arhythmorhynchus trichocephalus (Leuckart, in Kaiser 1893).

Sexually mature worms are 50 to 80 mm long with a general diameter of 0,5 to 0,8 mm. With a characteristic ovoid swelling of the body 2,3 to 2,9 mm behind the neck. This enlargement has a length of 1,6 to 2,4 mm and a diameter of 0,6 to 1,4 mm. The region between the neck and the body enlargement is 0,48 to 0,55 mm in diameter and bears numerous cuticular spines which are 28 to 35 μ long. The spindle-shaped proboscis, 1,03 to 1,2 mm in length and 0,4 to 0,5 mm in diameter, is covered with 20 longitudinal rows of 19 to 22 hooks each.

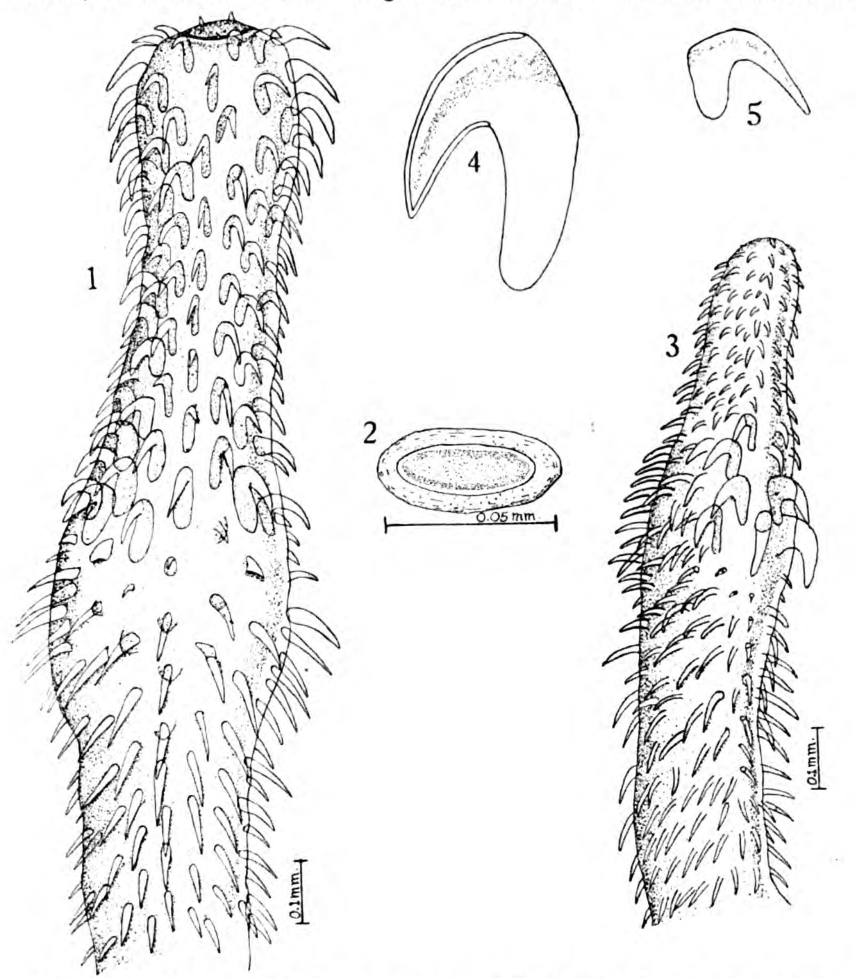


Fig. 1. Proboscis of Arh. uncinatus (Kaiser) in lateral view. From a cotype in the Leipzig Museum. Scale indicating magnification is 0,1 mm long.

Fig. 2. An embryo from the body cavity of a cotype of Arh. uncinatus. Scale has the value of 0,05 mm.

Fig. 3. Proboscis of Arh. trichocephalus (Leuckart, in Kaiser) in lateral view, showing differentiation of ventral hooks. Magnification same as in Fig. 1. From a specimen in the Leipzig Museum.

Fig. 4 and 5. Hooks from ventral and dorsal surfaces respectively at the same level upon the proboscis of Arh. trichocephalus. Redrawn from Kaiser, 1893, Pl. VI, figs. 23 and 18.

These are of two distinctly different types as in A. uncinatus, but differ from that species and resemble A. frassoni in that the ventral surface carries 4 or 5 hooks of extreme size and prominence in the region of its greatest diameter. Dimensions of embryos as given by Kaiser, 79 by 34 μ.

Types probably destroyed. Incorrectly identified immature specimens in the Leipzig Museum are the only known specimens belonging to this species.

In the Index Catalogue to the Roundworms, Stiles and Hassall (1920 :414) have given 1876 as the year from which this species dates. However, in Leuckart's references to this specific name there is nothing that could be considered as an „indication, definition or description" of the species. Consequently, the name Echinorhynchus trichocephalus Leuckart, 1876 must be considered as a nomen nudum. The first description of the species is that given by Kaiser (1893 :12) wherein he accredits the species to Leuckart. In view of these facts the species must date from the year 1893.

References.

Kaiser, J. E., Die Acanthocephalen und ihre Entwicklung. (Zoologica, Bd. 7. 1893. — Leuckart, R., Die menschlichen Parasiten und die von ihnen herrührenden Krankheiten. Leipzig 1876. — Lühe, M., Acanthocephalen. (Die Süßwasserfauna Deutschlands. H. 16.) Jena 1911. — Ders., Zur Kenntnis der Acanthocephalen. (Zool. Jahrb. Suppl. Nr. 15. 1912. S. 271—306.) — de Marvel, L., Monographie des Acanthocephalen d'Oiseaux. (Rev. Suisse Zool. T. 13. 1905. 195—386.) — Stiles, C. W., and Hassall, A., Index-Catalogue of Medi. and Veterin. Zoology. Subjects: Roundworms. Hygien. Lab. Bull. Nr. 114. U. S. Public Health Service. 1920.) — Van Cleave, H. J., A Revision of the Genus Arhythmorhynchus, with descriptions of two new species from North American Birds. (Journ. Parasitol. Vol. 2. 1916.) 167—174.

Parasitologische Untersuchungen und Beiträge zur parasitologischen Technik.

[Aus dem hygienisch-parasitologischen Institut der Universität Lausanne.]

Von **B. Galli-Valerio.**

Mit 1 Abbildung im Text.

a) Geographische Verbreitung einiger Parasiten.

1) Mycobacterium tuberculosis var. avium Maffucci. Hühner (Lausanne, Morges, Veytaux). Man verwechselt diese Krankheit mit der übertragbaren Hühnerleukose, speziell wegen Entfärbung und Gewicht der Leber. — 2) Microsporum audouini Gruby. Kinder (Château d'Oex.). Früher selten, jetzt, speziell nach dem Kriege, ziemlich verbreitet in der Schweiz. — 3) Blastocystis sp. (6—9—15 μ), Carduelis elegans (Lausanne). — 4) Oscillaria caviae Simons. Meerschweinchen (Lausanne). — 5) Sarcocystis blanchardi Doflein. Kuh (Chippis, Wallis). — 6) Eimeria stiedai Lind. Kaninchen (Chésières, 1210 m, Waadt), Lepus timidus (Cubly, 1162 m, Waadt). — 7) E. zürni Riv. Rinder (Weide von Tuilerie, 650 m, Waadt). — 8) E. sciurorum Galli-Val., Sciurus

vulgaris (Epalinges, 804 m, Waadt). — 9) E. avium Silv. et Riv. Hühner (Chamblandes (Waadt). — 10) Spirochaeta sp. von 8—9 μ, einige Formen etwas dicker als die anderen, mit 4—5 Windungen (Faeces von Cervus capreolus (Arpette, 1700 m, Wallis). — 11) Spirochaeta sp. von 20—30 μ, sehr fein, mit 8—10 sehr breiten Windungen (Cervix uteri einer Frau, Lausanne). — 12) Leptomonas davidi Laf., Euphorbia gerardiana (Darnona, 887 m, Wallis). Die Pflanzen waren mit Stenocephalus agilis bedeckt. Im Darme eines Stenocephalus Reproduktionsformen von Leptomonas. — 13) Herpetomonas pyrrhocoris Zotta et Galli-Valerio, Pyrrhocoris apterus (Avenex, Waadt). — 14) Lamblia intestinalis Lambl. var. cuniculi. Kaninchen (Lutry, Waadt). — 15) Fasciola hepatica L. Kuh (Chippis). — 15a) Distoma lorum Duj., Talpa europaea (Belle chaux, 1800 m, Freiburg). — 16) Dibothriocephalus latus Brems. var. tenella, von 5 mm Breite, zusammen mit einem Exemplar von 1,5 cm Br. Mann (Lausanne). — 17) Hymenolepis bacillaris Goeze, T. europaea (Belle chaux). — 18) H. linea Goeze, Perdix saxatilis (Leuck., 753 m, Wallis). — 19) H. exilis Duj. Hühner (Genf, Lausanne). — 20) Taenia saginata Goeze Mann (Chippis). — 21) T. crassiceps Zed., Vulpes vulgaris (Renens, Waadt). — 21) T. ocellata Rud., Perca fluviatilis (Lutry). — 22) Echinococcus polymorphus Dies. Kuh (Chippis). — 23) Triaenophorus nodulosus Rud., Perca fluviatilis (Lutry). — 24) Echinorhynchus angustatus Rud., ebenda. — 25) Ascaris canis Wern. Katze (Chippis). — 26) Heterakis perspicillum Rud. Hühner (Genf). — 27) H. papillosa Bloch., ebenda. — 28) Oxyurus obvelata Br., Mus sylvaticus (Forclazs/Avants, Waadt, 1600 m). — 29) Strongylus minutus Duj., ebenda, und T. europaea (Belle chaux). — 30) Str. commutatus Dies., Lepus timidus (Villars, 1215 m, Waadt). — 31) Trichocephalus unguiculatus Rud., Lepus timidus (Cubly). — 32) Trichosoma longicolle Rud., Lyrurus tetrix (Col de Chaude, 1627 m, Waadt), Lagopus mutus (La Brûlée, 1592 m, Wallis). — 33) Filaria muscicapae Linst., Muscicapa atricapilla (Cully, Waadt). — 34) Demodex folliculorum Sim. var. canis. Hunde (Lausanne). Die Hautschnitte zeigten eine sehr starke Entzündung mit vielen Parasiten in Talgdrüsen und Haarbälgen. — 35) Microthrombidium pusillum Haller. Larven (Gde. chaux, 1964 m, und Bec de Corbeau, 1995 m, Wallis, Soladier, 1641 m, Waadt). Im Sommer 1923 wurden einige Leute von Thrombidium-Larven sehr belästigt in Orbe (Waadt). — 36) Uropoda vegetans Latr., Aphodius sp. (Orbe). — 37) Menopon tridens, N. Podiceps auritus (Nyon, Waadt). — 38) Nirmus fuscomarginatus N. ebenda. — 39) Docophorus communis N., Merula nigra (Cully). — 40) Pulex sciurorum Bouch., Sciurus vulgaris (Epalinges). Diese Flöhe haben mich nie gestochen. Bei 18—20° haben sie 7 Tage gelebt.

b) Untersuchungen über Phytoparasiten.

1) Pathogene Wirkung von Sacch. guttulatus Robin. Schon 1919[1]) habe ich bei Kaninchen 2 Fälle von Meteorismus und Tod beschrieben, die, sehr wahrscheinlich, durch starke Entwicklung von

1) Schweiz. Arch. f. Tierheilk. 1919. H. 7/8.

S. guttulatus erzeugt worden waren. Zwei neue Fälle habe ich jetzt untersucht: Die Pilze waren im Darme so zahlreich, daß man an eine Kultur denken konnte.

2) Staphylomykose bei Lepus timidus. Schon 1907 hatte ich Gelegenheit, diese Krankheit in der Orbeebene zu untersuchen. Sie erzeugt sehr große Geschwüre mit dickem Eiter, ganz voll von Staphylokokken, und zwar speziell an den Pfoten lokalisiert. Im September 1923 habe ich die Hoden eines Rammlers, der am Mormont (Orbe) geschossen worden war, bekommen. Das ganze Drüsengewebe war zerstört, und an seiner Stelle saß gelber, dichter Eiter mit sehr vielen Staphylokokken. 1907 hatte ich die Varietät aureus von M. pyogenes kultiviert und 1923 die Varietät albus. Die 2 Formen können also die Staphylomykose der Hasen erzeugen. Diese Staphylokokken sind für Kaninchen sehr pathogen: Sie erzeugen Geschwüre an den Pfoten, eiterige Einschmelzung der Leber. Die Staphylokokken sind im ganzen Körper verbreitet. Nach Bürgi [1]) spielt Pulex goniocephalus eine große Rolle bei der Uebertragung dieser schweren Krankheit; ich glaube aber, daß in vielen Fällen die Hautverletzungen eine große Rolle spielen. Die infizierten Rammler können sehr wahrscheinlich die Staphylokokken sehr weit verbreiten.

3) Morphologische Beziehungen zwischen den Erregern von Maltafieber und von seuchenartigem Verwerfen der Kühe. Verschiedene Beobachter haben mit Recht bemerkt, daß diese Erreger sehr ähnlich sind. Die einzige Verschiedenheit besteht in den verschiedenen Krankheiten, die sie erzeugen. Aber in welche Gattung sind die 2 Mikroorganismen zu setzen? Wie für den Maltafiebererreger [2]), habe ich den Erreger des seuchenartigen Verwerfens morphologisch in den verschiedenen Kulturnährböden studiert. Die 2 Mikroorganismen haben die typische Gestalt eines Micrococcus, aber speziell in einigen Kulturnährböden erscheinen sehr kurze Stäbchen, die in alten Kulturen sehr oft eine birnenartige Form zeigen. Man hat es hier sehr wahrscheinlich mit Involutionsformen zu tun, nicht aber mit typischen Keulenformen, wie in der Gattung Corynebacterium. Ich halte es also für unmöglich, die 2 Mikroorganismen in diese Gattung zu bringen. Sie müssen vielmehr einen Platz zwischen der Gattung Bacterium und Micrococcus einnehmen. Ich schlage für sie den Gattungsnamen Coccobacterium vor.

c) Untersuchungen über Zooparasiten.

1) Durch Eier von Dicrocoelium lanceolatum Rud. erzeugte Pseudotuberkulose bei Lepus timidus. Die Leber eines in Villars (1215 m) geschossenen Hasen zeigte sehr viele weiße Tuberkeln von der Größe eines Stecknadelkopfes. Sie waren etwas derb und zeigten unter dem Mikroskop zerquetschte Rundzellen und ein Ei von D. lanceolatum. In den Schnitten fand sich eine rundzellige Infiltration mit Bindegewebe einwickelt und ein Ei von D. lanceolatum in der Mitte (Abb. 1). Diese interessante Pseudotuberkulose, die ohne mikroskopische Untersuchung als bazilläre Pseudotuberkulose der Nagetiere zu betrachten wäre, ist ganz identisch mit der Pseudotuberkulose, die ich aus Pferdelebern beschrieben habe und die durch

1) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 39. S. 559.
2) Centralbl. f. Bakt. Orig. Bd. 35. 1903. S. 81.

eine Embolie der Gallengänge mit Eiern von F. hepatica und D. lanceolatum erzeugt war [1]).

2) Ueber einen Cysticercus bei Sphaeridium scarabaeoides L. 1918 habe ich bei einem Aphodius obscurus einen noch nicht ganz entwickelten Cysticercus gefunden, den ich für die Larve von Cittotaenia marmotae Braun hielt [2]). Im August 1924 fand ich bei einem Sph. scarabaeoides, den ich in den Faeces von Rindern in Naye d'en Haut (1852 m) gefunden hatte, einen ganz entwickelten Cysticercus. Er war birnenförmig, von 305×150×120 μ, mit zahlreichen Kalkkörperchen. An dem dünneren Ende fand sich eine Verdickung mit 3 Paar Haken. Dies spricht immer mehr für die Vermutung, daß koprophage Käfer Zwischenwirte von Amnoplocephalinen sind.

2) Beobachtungen über Pediculus humanus L. var. capitis. Nach den verschiedenen Beobachtungen, die ich über diese Art gemacht habe [3]), scheint es, daß sie sich auf glatten Oberflächen sehr schwer und langsam bewegen kann, und nur am Rande von Tischen und Brettern die Bewegungen schneller sind. Läuse, auf eine Schnur gesetzt, haben nach 1/4 Std. 1—1,55—1,95 m durchwandert und in einem horizontalen Glasrohr mit etwas Sand haben sie in 1 Std. 19 cm, in 2 Std. 40—60—67 cm, in 3 Std. 70—75 cm und in 15 Std. 80—82 cm durchwandert. Also die Kopfläuse, die gewohnt sind, entlang den Haaren zu wandern, bewegen sich viel besser und schneller auf den Kanten und Schnüren als auf Flächen, auch wenn diese mit Sand bedeckt sind. Die Widerstandsfähiggeit der Kopfläuse dem Fasten gegenüber ist nicht immer verlängert, wenn sie niedrigen Temperaturen ausgesetzt sind. So z. B. sind Läuse bei 0° und 14—15° alle in 7 Tagen zugrunde gegangen.

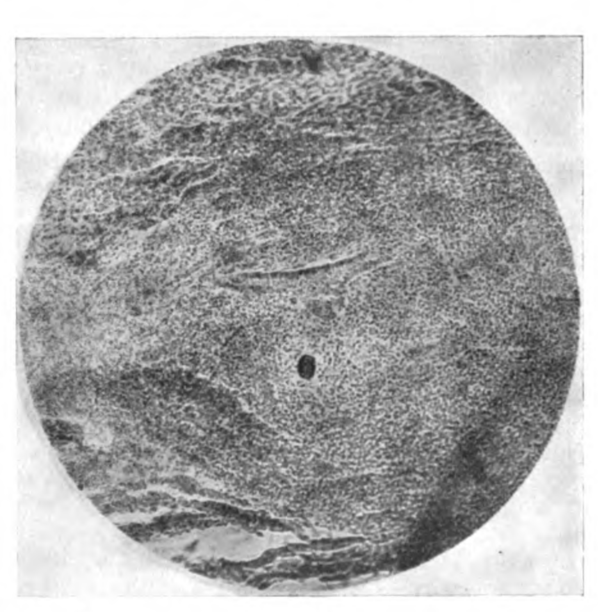


Fig. 1.

Die Wirkung von Tinctura sabadillae auf Kopfläuse hängt von der Anwesenheit von Harz in der Tinktur ab. In der T. sabadillae mit Harz sterben sie in 5 Min., während sie in T. sab. ohne Harz noch nach 1 1/4 Std. leben. Das Harz also, nicht aber die Alkaloide der T. sabadillae, wirkt parasitizid auf Kopfläuse. Jede Tinktur ohne Harz ist also nicht zu verwenden.

1) Arch. per le Sc. med. 1893. S. 173. 2) Schw. Arch. f. Tierheilk. 1918. S. 551.
3) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 77. 1915. S. 262; Bd. 78. 1916. S. 37; Bd. 79. 1916. S. 33; Korrespbl. f. Schweiz. Aerzte. 1918. H. 20.

d) Parasitologische Technik.

Materialien für Demonstrationszwecke. Daß Lösungen von 1 Teil Formalin und 99 Teilen Wasser, wie ich oft bemerkt habe, sehr geeignet sind zur Aufbewahrung von Material für Demonstrationszwecke, zeigen die folgenden Untersuchungen: Konservierter Eiter mit Strept. pyogenes und Strept. lanceolatus, ist nach 13 und 14 Jahren noch sehr gut färbbar.

In Glyzerin erhalten sich Saccharomyces farciminosus; Sarcoptes mutans und S. minor noch sehr gut nach 30 und 28 Jahren.

12. Sept. 1924.

Ueber „erzwungene" Antagonisten.

III. Mitteilung.

Reichslaboratorium für Chemie und Bakteriologie. Ukrainisches Rotes Kreuz, Laboratorium des Krankenhauses „Herbert Hoover".

Von Dr. **Ignaz Schiller**, Odessa.

In unserer II. Mitteilung[1]) haben wir nachgewiesen, daß, wenn Hefen (Bier- oder Weinhefen) sich zusammen mit Bakterien befinden, so es leicht gelingt, bei Anwendung verschiedener biologischer Methoden die Hefen in Antagonisten der Bakterien zu verwandeln. (Unter natürlichen Bedingungen sind die Hefen keine Antagonisten der Bakterien.) Der Antagonismus äußert sich in Ausscheidung bakteriolytischer Substanzen, welche die Bakterien auflösen.

Hier werden wir nachweisen, daß es auch für Bakterien möglich ist, solche Bedingungen zu schaffen, daß sie zu erzwungenen Antagonisten der Hefen werden und sie auflösen. Dieses Resultat ist, wie wir unten sehen werden, deswegen von Interesse, weil es die Frage aufwirft, ob es möglich wäre, auf rein biologischem Wege die Zymase zu gewinnen.

Versuch Nr. 1: In einen Kolben, der 100 ccm destilliertes Wasser enthält, wurden eine Bierhefenagarkultur und ein paar Oesen Staphylococcus aureus gebracht. Dem Milieu wurden noch 5 Tropfen Bouillon (ohne Pepton) zugefügt[2]). Nach 24 Std. bemerken wir bei mikroskopischer Betrachtung eine starke Vermehrung des Staphylokokken. Was die Hefen anbetrifft, so zeigten die meisten Zellen deutliche Schädigungen, indem die Membranen an verschiedenen Stellen Risse, durch welche das Plasma ausströmte, aufwiesen. Manche Hefezellen waren geschrumpft. Auf dem Präparate traten auch viele Stellen auf, auf denen nur Spuren von Hefezellen in Gestalt von leeren, ovalen Räumen zu sehen waren. Rings um diese leeren Räume waren die Staphylokokken dicht gelagert. Das sind die Spuren von verdauten Hefezellen.

---

1) Schiller, I., Ueber „erzwungene" Antagonisten. II. Mitt. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 92. 1924.)

2) Ders., Ueber „erzwungene" Antagonisten. 1. Mitt. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 91. 1923. H. 1.)



Fig. 1

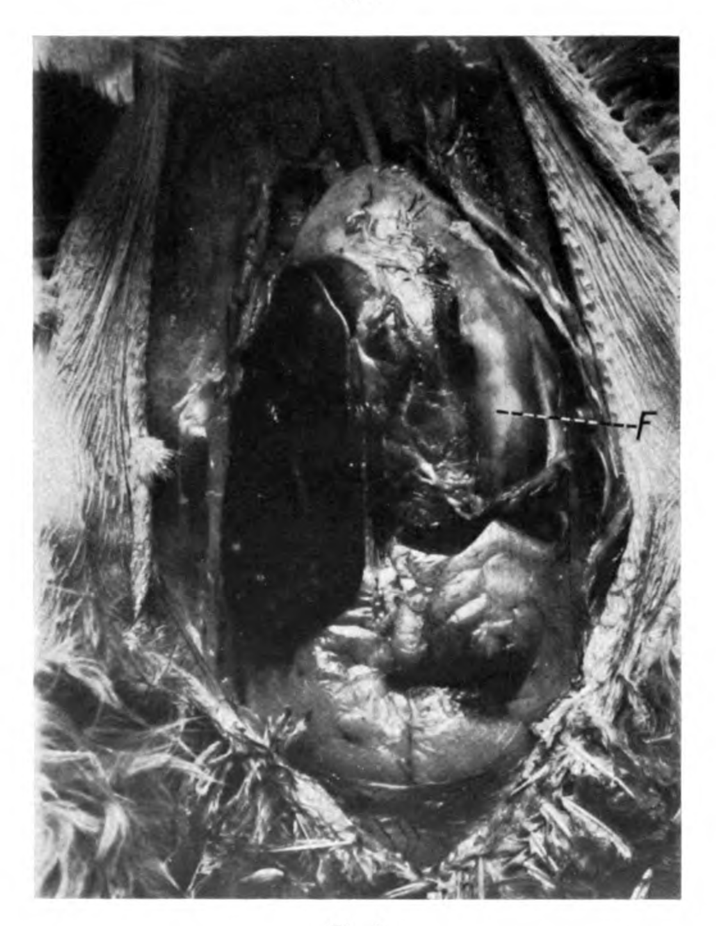


Fig. 3

Verlag von **Gustav Fischer in Jena.**

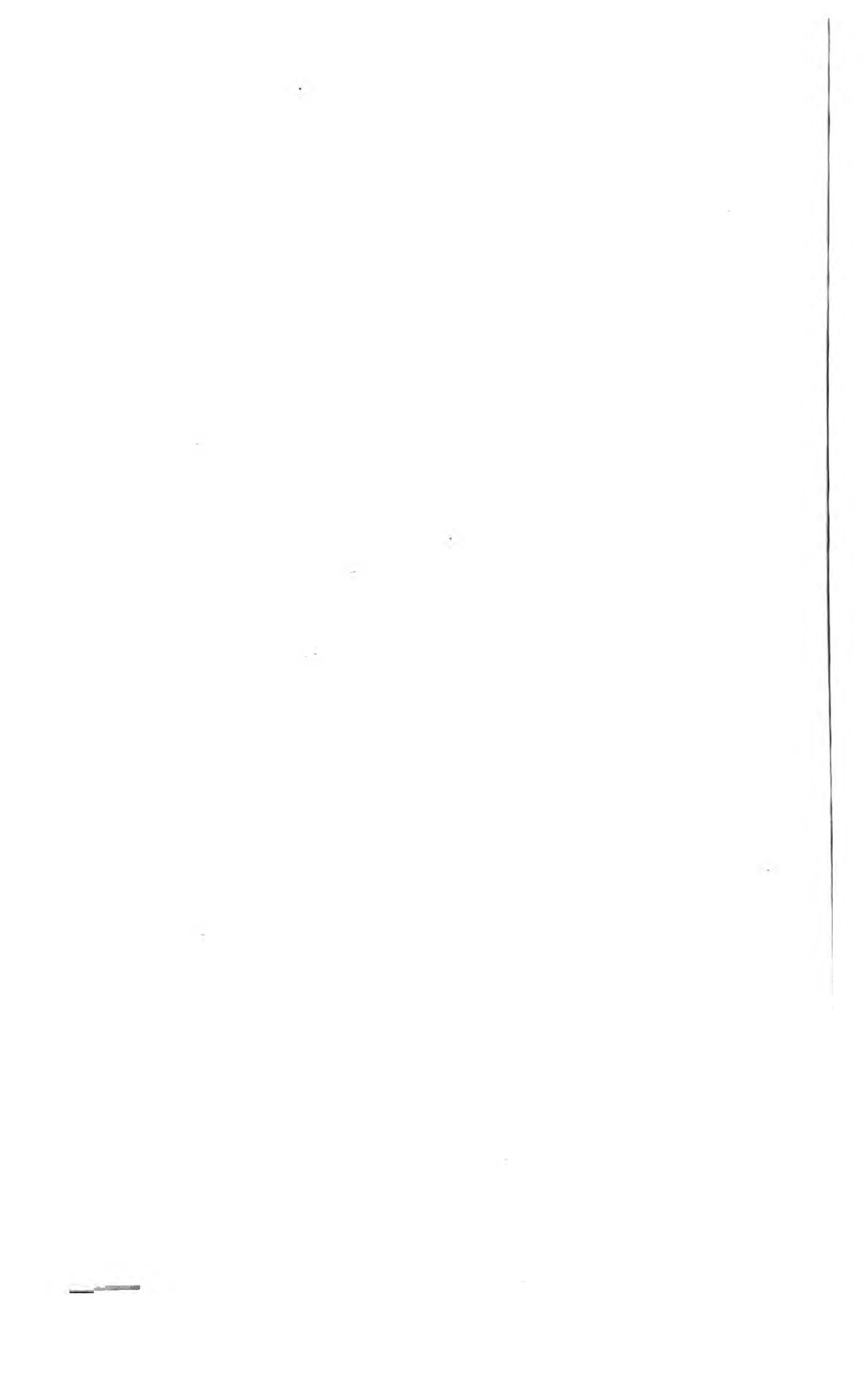




Fig. 2

Verlag von **Gustav Fischer** in **Jena.**

N
aphy
r ve
er z
eren
N
ändi
Ir
rien
ele
ubsta
iefez
ie W
llen
ing
ie v
or si
ertei
liese
Vass
V
wurd
risch
ier I
Verär
und

Riss

und

subs
an d
trafe

tech
Zers
Büc
und
so n
dun

We
übe
ob
aus
ein
ein

und

Nach 48 Std. schritt der Verdauungsprozeß weiter vor: die Staphylokokken nahmen das ganze Präparat ein. Von Hefen traten nur vereinzelte Zellen mit stark angegriffenen Membranen auf. Meistens aber zeigten sich Spuren derselben in Gestalt der schon erwähnten leeren Räume.

Nach 72stünd. Verweilen im Brutschranke waren die Hefen vollständig verschwunden.

In unserer Arbeit über die Verdauung der Bakterien durch Bakterien[1]) wurde nachgewiesen, daß der Verdauungsprozeß der lebenden Zelle dadurch zustande kommt, daß der Antagonist eine bakteriolytische Substanz fermentativer Natur ausscheidet. Bei der Verdauung lebender Hefezellen haben wir es mit derselben Substanz zu tun. Dabei läßt sich die Wirkung dieser Substanz dank der beträchtlichen Größe der Hefezellen leichter in allen Stadien verfolgen. Zum Nachweise dieser Wirkung verfuhren wir folgendermaßen: Der Kolben (100 ccm), in welchem die vollständige Verdauung der Bierhefen durch die Staphylokokken vor sich ging, wurde von allen Bakterien befreit, in Petri-Schalen verteilt und im Brutschranke bei 37° C evaporiert. Wir bekommen auf diese Weise einen trockenen, braungelben Ueberrest, der sich leicht im Wasser auflöste.

Versuch Nr. 2: Die ausgetrocknete, eben erwähnte Substanz wurde in 3 ccm destill. Wassers gelöst. 3 Objektträger wurden mit frischen, 48stünd. Bierhefen[2]) bestrichen und nach Abtrocknen mit der Lösung in Berührung gebracht.

Nach 10—20 Min. konnten wir auf dem 1. Objektträger folgende Veränderungen bemerken: Die Mehrzahl der Hefen war geschrumpft und ließ sich schlecht mit Fuchsin färben.

Oft begegneten uns Zellen mit zerrissener Membran. Aus den Rissen trat das Plasma heraus.

Auf dem 2. Präparate (nach $1/_2$ Std.) waren die Hefen zersplittert und nur selten fand man ungeschädigte Zellen.

Nach 3 Std. war auf dem 3. Präparate die Spaltung der Eiweißsubstanz der Hefezelle so weit vor sich gegangen, daß bei Fixierung an der Flamme keine Koagulation des Objektes eintrat. Nur vereinzelt trafen wir die Splitter der Hefen.

Wir bemerkten schon oben, daß dieses Resultat von biologisch-technischem Interesse ist. In der Tat, wenn wir uns erinnern, daß zur Zerstörung der Hefemembran, wie dies bei der Zymasegewinnung (nach Büchner) geschieht, nötig ist, die Hefen mit Kieselgur zu zerreiben und einer Pression von 60—90 kg pro Quadratzentimeter auszusetzen, so müssen wir staunen über die Leichtigkeit, mit welcher bei Anwendung unserer biologischen Methode die Zellmembranen zerstört werden.

Besonders interessant ist es, daß auch die Weinhefen auf diesem Wege ihrer Membran beraubt werden. Was aber die wichtige Frage über die Gewinnung der Zymase anbetrifft, so wissen wir noch nicht, ob unsere zytolytische Substanz keine schädigende Wirkung auf diese ausübe. So viel wissen wir nur, daß wir in allen denjenigen Fällen, wo eine größere Quantität von Hefen aufgelöst wurde (10 Agarkulturen), eine Substanz bekamen, die ihrem Aussehen nach an die Zymase er-

1) Schiller, l. c. Bd. 91. 1923. H. 1.
2) Alles, was wir hier über die Bierhefe mitteilen, bezieht sich auch auf Wein- und andere Hefearten.

innerte, nämlich eine gelbliche Masse, welche lebhaft Kohlensäurebläschen ausschied. Die Quantität war aber zu gering, um Zuckerlösung zur Gärung zu bringen.

Außer den Staphylokokken konnten wir eine ganze Reihe von Bakterien zur Verdauung der Hefen veranlassen. Als solche sind z. B. die Typhus-, Paratyphusbazillen, die Choleravibrionen, Proteus-Arten usw. zu nennen. Das proteolytische Vermögen begünstigt sehr den Verdauungsprozeß. Besonders energisch wurden die Hefen durch den Bacillus fluorescens angegriffen, der eine große Menge lytischer Substanz bildete.

Als fester Boden zur Verdauung der Hefen und zur Gewinnung des Fermentes (über die Natur desselben berichtete ich in meiner 1. Mitteilung) bewährte sich Agar ohne Bouillon, Pepton und Salz.

Bei Verwendung dieses Milieus bin ich von dem Gesichtspunkte ausgegangen, daß der Agar nicht genügend stickstoffhaltige Substanzen enthält, um den Bakterien zur Ernährung zu dienen. Deswegen werden die Hefen angegriffen, um aus ihnen die fehlenden Nährsubstanzen zu gewinnen. In der Tat bekommen wir auf solchen Nährböden ein üppiges Wachstum der Bakterien, welche auf Kosten der verdauten Hefen sich vermehren.

Zum Schlusse möchte ich noch die interessante Tatsache hervorheben, daß die lytische Substanz wirkungslos auf koaguliertes Serum und Hühnereiweiß ist.

Zusammenfassung der Resultate.

1) Wenn die Bakterien sich zusammen mit Hefen in einem stickstofffreien Milieu befinden, so werden sie zu Antagonisten der letzteren. — 2) Die Verdauung der lebenden Bier- oder Weinhefen erfolgt durch Ausscheidung einer zytolytischen Substanz. — 3) Die letztere wirkt auch bei Anwesenheit von Bakterien. — 4) Die zytolytische Substanz ist ohne Wirkung auf koaguliertes Serum und Hühnereiweiß. — 5) Die Möglichkeit, auf biologischem Wege die Hefemembran der Wein-, Bier- und anderen Hefen aufzulösen, ist vom Standpunkte der Zymaseforschung von Interesse.

Ueber Antagonismus zwischen Pneumokokken und Staphylokokken.

[Aus dem Epidemiologischen Institut in Nisch, S. H. S.]

Von Dr. **G. P. Alivisatos.**

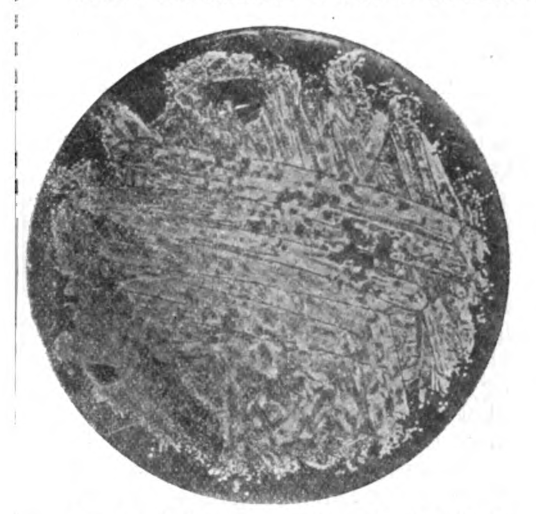
Mit 3 Abbildungen im Text.

Beim Studium des Antagonismus zwischen verschiedenen Mikroorganismen konnte ich einen solchen zwischen Pneumococcus und

Staphylococcus albus konstatieren, der bis jetzt, soviel ich aus der Literatur ersehen konnte, noch nicht beschrieben und insofern von Interesse ist, als er vielleicht bei weiterem Studium praktisch verwertet werden könnte.

Diesen Antagonismus konnte ich mit 28 bis jetzt untersuchten Pneumokokken- und 3 Staphylococcus albus-Stämmen hervorrufen, obwohl derselbe nicht überall von der gleichen Intensität war.

Die Versuchungsanordnung ist einfach: Man reibt in 0,1 ccm (auf 0,5 ccm durch sterile Bouillon ergänzt) einer 24stünd. Pneumococcus-Kultur in Ascitesbouillon $^1/_4$ Normalöse einer 24stünd. Kultur von Staphylococcus albus, bringt von dem gut durchgeschüttelten Gemisch 4 Oesen auf eine Ascites-Agarplatte, auf der sie ausgestrichen werden. Nach 24—48stünd. Bebrütung der Platten bei 37° kann man dann solche Bilder beobachten, wie sie auf den photographischen Aufnahmen 1 und 2 zu sehen sind:





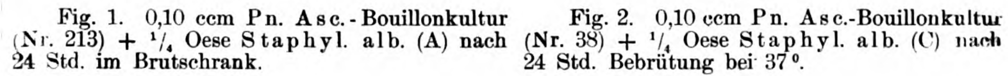


Fig. 1. 0,10 ccm Pn. Asc.-Bouillonkultur (Nr. 213) + $^1/_4$ Oese Staphyl. alb. (A) nach 24 Std. im Brutschrank.

Fig. 2. 0,10 ccm Pn. Asc.-Bouillonkultur (Nr. 38) + $^1/_4$ Oese Staphyl. alb. (C) nach 24 Std. Bebrütung bei 37°.

Wie aus diesen Abbildungen zu ersehen ist, ist die Intensität des Phänomens sehr verschieden, obwohl hier die Mengen überall gleich geblieben sind. Zuweilen sind (Abb. 1) auf der dicht mit Staphylokokken bewachsenen Platte einige Inselchen zu sehen, welche sehr an die der Bakteriophagen erinnern.

Bei näherer Betrachtung kann man kleine, einzeln stehende Pneumokokkenkolonien in der Mitte dieser Inselchen, von einem leeren Hof umgeben, sehen, welcher von den gezackten Rändern des Staphylococcus-Rasens begrenzt ist.

In anderen Fällen sind die Inseln viel größer (Abb. 2). Die Pneumokokkenkolonien sind in der Abb. 2 deutlich sichtbar, der leere Hof um die Kolonien ist viel breiter, und es scheint, wie wenn das Wachstum der Staphylokokken in ziemlich großer Entfernung angehalten worden wäre.

Diese beiden Abbildungen können als extreme Grenzen des Phänomens angesehen werden; zwischen diesen Extremen kann man alle Uebergänge beobachten. Nun kann es bei einigen Pneumokokken-Stämmen vorkommen, daß die ganze Platte dicht von Pneumokokken bewachsen wird und keine einzige Staphylokokkenkolonie zur Entwicklung gelangt, obwohl die oben angeführten Mengen beibehalten wurden. Nimmt man nur die Hälfte (also 0,05 der Ascites-Bouillonkultur) von Pneumokokkenstämmen, so bleibt zuweilen das Wachstum der Staphylokokken wieder aus, oder aber die Pneumokokken wachsen stark auf der ganzen Platte, während die Staphylokokken nur an den Randpartien der Platte, rings herum einen schmalen Saum um dem Pneumokokkenrasen bilden. Selbstverständlich sieht der innere Rand des Saums wieder gezackt aus, wie es bei den oben beschriebenen Inseln der Fall war. Wird in solchen Fällen die Menge der Pneumokokken von neuem vermindert, so kann man öfters solche Inseln bekommen, wie sie auf den Abbildungen zu sehen sind. Zum Vergleich haben wir das Pneumokokken-Staphylokokken-Gemisch in den Fällen, in denen die Staphylokokken nicht angegangen sind, 24 Std. bei Zimmertemp. (im Dunkeln) gelassen und hierauf mit einigen Oesen von diesem Gemisch neue Ascites-Agarplatten besät. Alsdann sind die Staphylokokken sehr üppig gewachsen, aber keine Pneumokokken. Offensichtlich waren die Pneumokokken abgestorben, was einem Mangel an Nährstoffen zuzuschreiben ist, denn es waren auch aus den Kulturröhrchen, in denen nur Pneumokokken in Bouillon emulsioniert und 24 Std. bei Zimmertemp. gelassen waren, keine Kulturen mehr zu erhalten. Betrachtet man nun die so angefertigten Platten mit der Lupe oder bei schwacher Vergrößerung, so kann man gleich konstatieren, daß außer den Inseln auch einzelne Pneumokokkenkolonien sich vorfinden, umgeben von Staphylokokkenrasen, und hier ist auch der Hof (bei schwacher Vergrößerung) gut sichtbar.

Es kommen aber auch Pneumokokkenstämme vor, welche, mit Staphylokokken vermischt, schöne große Inseln zeigen, doch fehlt der Hof um die Pneumokokkenkolonien vollständig; es können sogar hie und da die Staphylokokkenkolonien jene der Pneumokokken berühren, oder die der einen dicht an denen der anderen liegen. In solchen Fällen erscheinen die Staphylokokkenkolonien wie angefressen, d. h. die Randpartien derselben sind nicht abgerundet, sondern fein und unregelmäßig gezackt. In den so entstandenen Buchten sind im Staphylokokkenrasen Pneumokokkenkolonien zu finden.

Obwohl nun die Mischung von Staphylokokken und Pneumokokken innig war, waren Mischkolonien auf der Ascites-Agarplatte nie zu sehen, und aus allen Platten habe ich von den Pneumokokken- oder Staphylokokkenkolonien wieder reine Pneumokokken bzw. Staphylokokken züchten können. Auch habe ich nie Staphylokokken und Pneumokokkengemische finden können bei Ausstrichpräparaten, welche von solchen Platten angefertigt waren.

Nachdem wir nun das Phänomen als solches im allgemeinen beschrieben haben, wollen wir auf Einzelheiten desselben eingehen:

Wie schon angeführt, haben wir dieses Phänomen bei 28 Pneumokokken- und 3 weißen Staphylokekkenstämmen (A, B, C) zum Vorschein bringen können. Die Staphylococcus-Stämme waren vor kurzem gezüchtet, 2 davon (A, B) aus Furunkel, 1 (C) aus Akne. Von den Pneumokokkenstämmen waren 22 in den letzten 3 Jahren

in Nisch (aus Pneumoniesputum, Liquor cerebrospinalis oder Empyem des Thorax usw.) gezüchtet, die übrigen (6) stammten aus Prof. Přibrams Sammlung in Wien; letztere sind nicht näher studiert, dagegen sind erstere durchgehends untersucht und klassifiziert worden.

Die Technik ist eingangs beschrieben: es genügt, hinzuzufügen, daß jeder Staphylococcus-Stamm mit allen Pneumokokkenstämmen in 3 oder noch mehr Mengenverhältnissen untersucht wurde, und daß jeder Serie 2 Kontrollplatten hinzugefügt wurden, von denen die eine nur mit dem betreffenden Staphylococcus-, die andere nur mit dem zu untersuchenden Pneumococcus-Stamm beimpft war.

Alle in Nisch gezüchteten Pneumokokken wurden auf Ascites-Agarröhrchen aufbewahrt und 3mal monatlich überimpft. Die Staphylokokken dagegen züchteten wir auf gewöhnlichem Agar.

Die in Nisch gezüchteten Pneumokokken sind als solche auf Grund folgender Feststellungen anerkannt: Gram-positive, lanzettförmige, als Diplo- oder in kurzen Ketten auftretenden Kokken; Auflösung in Galle oder taurocholsaurem Natron (10 Proz.) bei sofortiger Untersuchung nach der Erstzüchtung; Mäusepathogenität; schließlich wurde noch das Wachstum auf Kochblutagar überall untersucht (Bieling), nur wurde dieser Nährboden nicht mit Pferde-, sondern mit Kaninchenblut bereitet, und zwar folgendermaßen: Zu $7^1/_2$ ccm defibriniertem, steril entnommenem Kaninchenblut werden zugesetzt 100 ccm 3proz. Agar (bei 80°, pH 7,8), gut durchgemischt, die Mischung sofort durch sterilisierte, 4fache Gaze filtriert und steril in Röhrchen oder Platten gegossen. Man kann auch die Röhrchen 2′—3′ in kochendem Wasser halten und dann erstarren lassen, oder zu Platten ausgießen. Beim Erstarren setzen sich an den Wänden des Röhrchens tiefbraune, gröbere Niederschläge nieder.

Der nicht gekochte Blutagar ist etwas rötlicher und weist viel weniger Niederschläge als der gekochte auf, welcher eine kakaobraune Farbe hat. Auf dem gekochten Agar wachsen die Pneumokokken zarter als auf dem ungekochten, und zwar sind die nebeneinander wachsenden Kolonien stecknadelkopfgroß, während die auf nicht gekochtem Blutagar gewachsenen Kolonien grieß- bis hirsekorngroß sind. Auf diesem Nährboden wuchsen alle Pneumokokken in saftigen Kolonien, welche von einer gelbgrünlichen Zone umgeben sind; dort, wo das Wachstum üppig ist, sind auch die einzelnen Zonen verschmolzen, so daß große, gelb bis gelb-grünliche Flecken auf dem kakaobraunen Nährboden entstehen.

Als Merkmale zeigten die weißen Staphylokokken positive Gram-Färbung, typische Lagerung, Gestalt und Kolonienform. Von den 3 untersuchten Stämmen war keiner imstande, Hämotoxine zu bilden.

Wir haben schon erwähnt, daß die Intensität des Phänomens auch bei Beibehaltung der oben erwähnten Mengen für die verschiedenen Stämme verschieden sein kann, und daß öfter schöne, große Inseln auf der Platte zum Vorschein kommen, manchmal dagegen nur Flecken, welche an das Phänomen des Bakteriophagen erinnern.

Worauf beruht nun die verschiedene Intensität des Phänomens?

1) Die Virulenz der Pneumokokken scheint keinen Anteil daran zu haben, denn wir haben 7mal sehr schöne große Inseln mit Pneumokokken erhalten können, welche, vor 1—2 Jahren isoliert, auf Ascitesagar während dieser Zeit fortgezüchtet waren, und von denen $^1/_{1000}$ ccm

einer 24stünd. Ascitesbouillonkultur nicht mehr eine 20 g schwere Maus tötete.

2) Hängt die Intentsität des Phänomens vom Pneumokokkentypus ab? Es scheint auch dieses nicht der Fall zu sein. Mit Originalpneumokokkenserum[1]) habe ich den Typus bestimmt, dem die in Nisch isolierten Stämme angehörten. 0,9 ccm der 24stünd. Ascitesbouillonkultur wurden jeweils mit 0,1 ccm des betr. Serums gemischt und nach 3stünd. Aufenthalt im Brutschrank (bei 37⁰) 24 Std. stehen gelassen; alsdann wurde das Resultat abgelesen. Jeder Pneumococcus-Stamm wurde mit allen Immunseren des Typus I—III untersucht; jeder Serie wurde ein Kontrollröhrchen mit Pneumokokkenbouillonkultur hinzugefügt. Die Ergebnisse sind folgende:

7	Stämme	(2 aus Empyemen des Thorax) gehörten dem Typ.	I	an
9	„	„ „ „	II	„
3	„	(1 aus einem Fall von Meningitis) „ „ „	III	„
3	„	gaben keine Agglut. mit den Immunseris (Typ. IV?). „	I—III	

Bemerkt sei, daß einige Pneumococcus-Stämme (z. B. Nr. 657 [Typ. I], Nr. 251, 871 und 806 [Typ. II]), mit allen Immunseris Agglutination gaben. Bei näherer Betrachtung konnte jedoch festgestellt werden, daß die Agglutination mit 2 von den Immunseren feinflockig, dagegen mit dem dritten grobflockig war, so daß nur die letztere als die spezifische Agglutination anzusehen ist. Desgleichen haben einige Streptokokkenstämme mit Pneumokokkenimmunserum alle feinflockige Agglutination gegeben.

Teilt man nun die Ergebnisse, was die Größe der Inselbildung anbelangt, nach den Pneumokokkentypen ein, so sehen wir, daß 5 Stämme vom Typ. I, 5 vom Typ. II, 1 vom Typ. III und 2 von den inagglutinablen Stämmen mit den Staphylokokkenstämmen A und C bei Innehalten der eingangs angegebenen Mengenverhältnisse ungefähr gleich große und schöne Inseln gegeben haben. Mit dem Staphylococcus B haben diese Pneumokokken durchhweg kleine Inseln gegeben, vielleicht weil dieser Staphylococcus bereits 2—8 Tage nach seiner Isolierung geprüft wurde.

Alle übrigen Pneumokokkenstämme bildeten mit allen Staphylokokkenstämmen kleine Inseln.

Wie nun aus dem vorher Gesagten zu ersehen ist, ist der Pneumokokkentyp ohne Belang für die Intensität des Phänomens, dagegen scheint es, als ob frisch gezüchtete Staphylokokken etwas widerstandsfähiger im Antagonismus gegenüber den Pneumokokken sind als ältere Kulturen.

Bezüglich der Mengenverhältnisse der Staphylokokken und Pneumokokken im Gemische ist zu bemerken, daß man im allgemeinen viel geringere Mengen Pneumokokken als Staphylokokken nehmen muß, sonst kann man erleben, wie ausgeführt wurde, daß die Staphylokokken gar nicht angehen, oder nur am Rande der Platte wachsen. Nimmt man aber weniger als 0,01 ccm Pneumokokken-Ascitesbouillonkultur, so kann es vorkommen, daß auch die Pneumokokken nicht angehen.

---

1) Das Serum verdanke ich der Freundlichkeit Mrs. Mary Kirkbride vom Department of Health, State of New York. U. S., der ich auch an dieser Stelle meinen besten Dank aussprechen möchte.

Von den in Nisch isolierten Stämmen, welche bei einem Mengenverhältnis 0,1 Pn. + $^1/_4$ Oese St. schöne Inseln gaben, haben wir 9 Stämme in steigenden Dosen (0,01 ccm, 0,05 ccm, 0,1 ccm, 0,2 ccm, 0,5 ccm) mit gleicher ($^1/_4$ Oese) Menge Staphylokokkenkultur (A, B, C) gemischt, um somit das Phänomen einer quantitativen Prüfung zu unterziehen. Die Resultate waren folgende:

Bei sehr kleinen Pneumokokkenmengen (0,01 ccm) sind die Inseln, wenn sie überhaupt auftreten, spärlich und klein, bei größeren Pneumokokkenmengen (0,05—0,1 ccm) kann man zumeist sehr schöne Inseln erhalten. Bei noch höheren Pneumokokkendosen (0,2—0,5 ccm) kann es vorkommen, daß nicht die Pneumokokken, sondern die Staphylokokken Inseln inmitten des Pneumokokkenrasens bilden. Diese Inseln bestehen aus kompakten Kolonienagglomeraten, deren Ränder tief gebuchtet und unregelmäßig unter dem Mikroskop erscheinen. Wie oben wiederholt gesagt wurde, kann man in diesen Buchten Pneumokokkenkolonien finden; es fehlt aber auch hier der Hof um dieselben, vielmehr können die Kolonien des einen Kokken jene des anderen berühren.

Wie aus meinen Ausführungen hervorgeht, scheint es, als ob die Intensität des Phänomens nicht nur von den Eigenschaften der gebrauchten Pneumococcus, bzw. Staphylococcus albus-Kulturen, sondern auch von dem Mengenverhältnis, das zur Anwendung gelangt, abhängig ist.

Es sei nun bemerkt, daß das Phänomen nichts zu tun hat mit der bekannten Tatsache[1]), daß Staphylokokkenkulturen zuweilen Bakteriophagen enthalten können; es ist nicht schwer, im Rasen verschiedener Staphylokokkenstämme hellere und durchsichtigere Stellen aufzufinden. Betrachte' man nun diese helleren Stellen unter dem Mikroskop, so kann man gleich konstatieren, daß die Kolonien hier klein, unregelmäßig, oft ohne scharfe Ränder, wie angefressen ausschauen, man könnte sie Koloniensplitter nennen. Diese Erscheinung ist jedoch viel ausgesprochener bei der Mischung von Staphylokokken und Pneumokokken, außerdem kommen hier Inseln vor, in denen der Staphylococcus überhaupt nicht wachsen kann; es ist sogar nicht selten, daß bei etwas größeren Pneumokokkenmengen der Staphylococcus überhaupt nicht angeht. Es handelt sich also um einen ausgesprochenen Antagonismus zwischen Pneumococcus und Staphylococcus.

Um uns zu überzeugen, ob die Pneumokokken, die in den Inseln oder Buchten wachsen, irgendeine Aenderung erlitten haben, haben wir jedesmal Ausstrichpräparate aus diesen Kolonien angefertigt und konstatiert, daß die Kokken, was Form und Färbbarkeit anbelangt, keine Unterschiede im Vergleich zu Pneumokokken, die allein auf Ascitesagar gewachsen waren, zeigten. Ueberimpfungen aus den Pneumokokkenkolonien der Inseln konnte man mit Erfolg noch 6 Tage nach Besäen der Platte vornehmen.

Auch die Staphylokokken, die aus dem gut gewachsenen Rasen untersucht wurden, zeigten keine Aenderungen.

In den von den angenagelten Kolonien angefertigten Präparaten fand man jedoch Kokken, die größtenteils ihre Gram-Positivität verloren hatten und groß und blaß erschienen. Abimpfungen von diesen Stellen konnte ich mit Erfolg noch 23 Tage (länger ist es nicht

---

1) Referat in Hyg. Rundsch. Bd. 22. S. 871. R. Bruynoghe u. J. Maisin.

versucht) nach Aussaat des Staphylokokken-Pneumokokken-Gemisches vornehmen.

Wie kommt nun das Phänomen zustande? Es scheint, daß es sich nicht um eine Erschöpfung des Nährbodens seitens des Pneumococcus handelt, denn der Staphylococcus stellt keine großen Ansprüche an den Nährboden.

Ob hier Stoffwechselprodukte des Pneumococcus, welche für den Staphylococcus schädlich wären, im Spiele sind, muß nunmehr untersucht werden; bisher haben wir nur nach einer Richtung uns Klarheit zu verschaffen versucht. Da wir häufig, wie erwähnt, Bilder auf der Ascites-Agarplatte bekamen, welche an jene des d'Herelleschen Phänomens erinnern, war der erste Gedanke, daß es sich hier vielleicht um irgendeine lytische Substanz handelt, welche von Pneumokokken sezerniert, eine Art Lyse des Staphylococcus hervorruft, oder sein Wachstum hemmt. Wir haben nun nach dieser Richtung folgende Versuche aufgestellt: Die während dieses Jahres isolierten 11 Pneumokokkenstämmme wurden in Ascitesbouillon (pH 7,8) geimpft, und zwar jeder Stamm in 3 Kölbchen. Nach 1- bzw. 2- oder 3wöchiger Bebrütung bei 37° wurden diese Kulturen durch Reichel-Filter, jede für sich filtriert und dann mit dem Filtrat Versuche nach folgendem Schema ausgeführt: Jeder Staphylococcus-Stamm wurde auf einer Agar- bzw. Ascitesagarplatte verstrichen, alsdann wurden auf der Oberfläche der Platte 4—5 Tropfen von einem der Filtrate aufgetropft; die Platten ließ man trocknen und bebrütete sie bei 37° während 24 Std. Dasselbe wurde so wiederholt, daß jeder Staphylococcus-Stamm fast mit jedem der 1-, 2- bzw. 3wöchigen Filtrate der einzelnen Pneumokokkenstämme geprüft wurde. Jeder Serie wurde zur Kontrolle eine Platte beigegeben, die nur mit einigen Tropfen des Filtrates bestrichen war, um seine Sterilität zu prüfen.

Nun sind auf allen Platten alle Staphylokokkenstämme ausnahmslos sehr üppig und ohne Inselbildung gewachsen, ein Beweis dafür, daß das Phänomen nicht zu irgendeiner sezernierten oder sonstwie freigewordenen Substanz der Pneumokokken in Beziehung steht, sondern daß sein Entstehen abhängig ist von dem lebender und entwicklungsfähiger Pneumokokken.

Schließlich haben wir noch untersucht, ob das beschriebene Phänomen nur dem Pneumococcus oder auch anderen, ihm nahestehenden Mikroorganismen zukommt.

Wir haben zu diesem Zweck die gleichen Staphylokokkenstämme mit 14 Streptokokkenstämmen nach derselben Versuchsanordnung geprüft. Von den Streptokokken waren 8 hämolytische Stämme, 5 Viridans-Streptokokken und 1 Mucosus-Stamm (Wien). Die Technik blieb die gleiche, nur wurde die Menge der Streptokokkenbouillonkultur etwas höher genommen (0,20—0,50 ccm), da Vorversuche gezeigt hatten, daß die Streptokokken, in solchem Verhältnis mit Staphylokokken gemischt, nicht oder schlecht wachsen. Nach 24 bzw. 48 Std. untersuchte ich die mit der Mischung hergestellten Platten. Ich möchte nun gleich anführen, daß sich' auf keiner der untersuchten Platten Inseln fanden. Die Streptokokken- und Staphylokokkenkolonien (mit der Lupe oder bei schwacher Vergrößerung betrachtet) lagen dicht nebeneinander; sie berührten sich an mehreren Stellen, dabei waren ihre Ränder rund und regelmäßig. Es kam auch vor, daß man Kolonien traf, deren eine Hälfte aus Staphylokokken, die andere aus Streptokokken bestand.

Erwähnt sei noch, daß auch Kolonien angetroffen wurden, die aus einem Gemisch von Staphylokokken und Streptokokken bestanden, was wir bei der Aussaat der Pneumokokken-Staphylokokkenmischung nicht beobachten konnten. Ueberwog bei diesen Mischkolonien der Streptococcus, so waren dieselben durchsichtiger, beim Ueberwiegen der Staphylokokken waren die Kolonien undurchsichtiger, grobkörniger und von fahlgelber Farbe. Der Befund konnte durch Ausstrichpräparate bestätigt werden. Sehr selten und nur ausnahmsweise fanden sich Koloniensplitter in den so bereiteten Mischplatten. Es kam auch gelegentlich (3mal, und das bei Streptococcus mucosus), vor, daß der Streptococcus an den Randpartien der Platte, der Staphylococcus dagegen in der Mitte wuchs. Bei Lupenbetrachtung aber konnte man im Bereich des Staphylococcus-Rasens einzelne Streptococcus-Kolonien erkennen, welche mit den ersteren in Berührung standen. Die Abbildung 3 zeigt einen solchen Fall; man kann auf dieser Platte sehen, wie der eine Rasen in den andern ohne eine Demarkationszone und ohne Inselbildung übergeht.



Fig. 3. 0,20 ccm Streptoc. mucosus asc.-Bouillonkultur (Wien) + 1/4 Oese Staph. alb. (A) nach 24 Std. Bebrütung bei 37°.

Zusammenfassung.

Es wird eine Art Antagonismus zwischen Pneumococcus und Staphylococcus albus beschrieben, welcher bei Mischung der beiden Kokkenarten und Plattenausstrich durch Inselbildung in charakteristischer Weise zum Vorschein kommt. Dieser Antagonismus kommt nicht zwischen Streptokokken (hämolytische und Viridans-Arten) und weißen Staphylokokken vor. Wenn sich nun bei weiteren Untersuchungen das Phänomen als konstant, nur dem Pneumococcus zukommend, erweisen sollte, so ließe sich dasselbe vielleicht insofern praktisch verwerten, als man damit frische oder alte Pneumokokkenstämme von den ihnen nahestehenden Streptokokken scharf unterscheiden könnte.

Farbstoffbildner in Renkeneiern.

[Bayerische Biologische Versuchsanstalt für Fischerei.]

Von Dr. **Adolf Seiser**, München.

Vor 40 Jahren berichtete Bonnet in der Bayerischen Fischereizeitung über einen seltsamen Fall von farbigen Renkeneiern. Weder vor noch nach Bonnet weist die Literatur eine Notiz über eine ähnliche Beobachtung auf. Trotzdem sind solche Funde wohl nicht gar so selten ,wie es fürs erste erscheinen möchte; eine Durchmusterung der Brutapparate der Fischzuchtanstalten wird manchesmal zu einem positiven Ergebnis führen. Instituten, die mit dem praktischen Fischzuchtbetrieb in enger Fühlung stehen, ist diese Erscheinung deshalb nicht unbekannt. Die Zahl der Fälle schwankt erfahrungsgemäß in den einzelnen Jahren, ohne daß es bisher gelungen wäre, die ursächlichen Zusammenhänge aufzuklären, die diesen Schwankungen zugrunde liegen. Im vergangenen Jahre wurden nach Mitteilung von Herrn Dr. Scheffelt in Langenargen farbige Eier des öfteren gefunden, und auch anderwärts scheinen gewisse Umstände ein gehäuftes Auftreten der Färbungen begünstigt zu haben. Herrn Prof. Scheuring verdanke ich eine Probe von einer Anzahl solcher Eier aus der Anstalt des Fischereivereins zu Starnberg, Herrn Dr. Scheffelt eine Probe aus Langenargen. In beiden Fällen waren Bruttröge als Fundstellen genannt.

Nach der Mitteilung Bonnets zeigte eine Reihe von Coregonus-Eiern schon im Eistropfapparat bei 0° C und wenig Wasser vereinzelt rote und blaue Flecken. Bei Ueberführung in die Brutapparate nahmen die Färbungen an Häufigkeit wie an Ausdehnung zu. Es mehrten sich die Unterschiede in der Intensität und der Art der Tönung, während zugleich die Eier mit einem weißflaumigen Belag von Saprolegnien umkleidet wurden. Im wesentlichen deckt sich die Darstellung Bonnets mit dem Befunde der an mich gelangten Proben, so daß es zweckmäßig ist, seine Schilderung im Auszug meinen Untersuchungen voranzustellen:

„Vom rein weißen, undurchsichtig gewordenen Ei finden sich alle Uebergangsfarben zum blassen Schwefelgelb, Hochgelb und Orange, vom zartesten Fleischrosa bis zum intensiven Karmoisin; daneben Zinnoberrot, Hellblau, Violett und Enzianblau. Neben diesen reinen Farbtönen fallen auch mehr schmutzig oder verwaschen aussehende auf vom Graugelben bis Bräunlichen, oder sogar völligem Schwarz. Nur rein grüne Töne scheinen völlig zu fehlen.

Die Farbe ist entweder gleichmäßig über die ganze Eioberfläche verbreitet, oder an einzelnen Stellen zu intensiveren Flecken gesteigert. An manchen Eiern finden sich nur vereinzelte, meist intensiv braun, gelb oder rot gefärbte Flecken. Auffallend ist, daß man mitunter doppelt gefärbte Eier finden kann. So fand ich ein halb violett, halb karmoisinrot und ein schmutzig blau und schwarz gefärbtes Ei. Viele der gefärbten Eier sind mit dem charakteristischen Belag von Saprolegnien in wechselnder Masse bedeckt. Genauere Untersuchung lehrt, daß nur bei einigen stellenweise gelb oder rostfarbig fleckigen Eiern die Kapsel gefärbt erscheint, während sie bei allen anderen Eiern farblos ist. Die nur in gelben Farbentönen auf der Kapsel auftretenden Flecken erwiesen sich mittels der Prolsschen Probe (Ferrozyankalium und chemisch reine Salzsäure) als Rost, und es ließ sich nach eingezogenen Erkundigungen feststellen, daß die Eier auf einem Drahtrostapparat gelegen hatten.

Diese Art der Färbung ist also von vornherein von den übrigen Farben auszumustern. Sie kommt mitunter auf Drahtrösten in Bruttrögen vor, deren Verzinnung gelitten hat.“

Von dieser Darstellung weichen meine Beobachtungen nur insoweit ab, als sich unter meinem Untersuchungsmaterial weder rostfarbene, noch enzianblaue, noch schwarze Eier fanden, dagegen ausgesprochen grüne in der Starnberger Probe.

Das massenhafte Vorkommen von Spaltpilzen in den undurchsichtig gewordenen, gefärbten und ungefärbten Eiern rief bei Bonnet sofort den Gedanken wach, es könnten farbstoffbereitende Pilze die Ursache dieser Färbungen sein. Die Untersuchungen seines Mitarbeiters Peter verliefen in dieser Richtung ergebnislos. Das Isolierungsverfahren mit Kochs Plattenkultur war wohl damals noch nicht zum Allgemeingut geworden, und die Anhäufungsversuche Peters in flüssigem Medium war nach Lage der Dinge so gut wie aussichtslos. In Rohkulturen pflegt die Farbstoffproduktion ja selbst bei hinreichender Entwicklung der Farbstoffbildner durch die Begleitbakterien geschädigt oder unterdrückt zu werden. In Anbetracht der fortgeschrittenen Zersetzungserscheinungen (Bonnet berichtet von einem penetranten Fäulnisgeruch) hatten die typischen Fäulniserreger aber sicher soweit die Oberhand gewonnen, daß ihre Konkurrenz ein Aufkommen der Farbstoffbildner verhindern mußte. Die mißlungenen Kulturversuche konnten Bonnet in seiner gefaßten Meinung nicht irre machen. In Anbetracht der „noch recht fragmentarischen Kenntnisse über die Morphologie und Physiologie der farbstoffbereitenden Pilze" glaubte er, die Ergebnisse Peters, der sich nach unseren heutigen Begriffen zu recht abenteuerlichen Schlußfolgerungen verleiten ließ, an Hand von hinreichendem neuen Material überprüfen zu müssen. Weitere Mitteilungen in dieser Angelegenheit sind aber nicht mehr erfolgt.

Aus den beiden mir übermittelten Proben suchte ich die Farbstoffbildner mit Hilfe des Plattenverfahrens auf Agar zu isolieren. Die Eikapsel wurde nach äußerlicher Säuberung mit sterilem Skalpell durchtrennt. Der intensiv gefärbte Inhalt des Eies, der zähschleimig aus der Oeffnung quoll, diente als Impfmaterial. Auch die Isolierung mittels dieser Methode stieß auf erhebliche Schwierigkeiten. Die zähschleimige Konsistenz des Impfmaterials verhinderte eine weitgehende Verteilung der Keime. Ueberdies waren die Farbstoffbildner von den Begleitbakterien offenbar schon so überwuchert und geschädigt worden, daß aus den stark in Zersetzung begriffenen Eiern der 1. Probe nur der grüne Farbstoffbildner isoliert werden konnte. Die 2. Probe befand sich in frischerem Zustand. Der Eiinhalt wurde diesmal unter Zugabe von sterilem Leitungswasser mittels Glasspatels zu einer homogenen Aufschwemmung verrieben. Erst dann erfolgte der Ausstrich auf eine große Zahl von Platten. Es wurden 3 der intensivst gefärbten Eier ausgewählt, ein ausgesprochen karmoisinrotes, tiefviolettes und gelbes Ei. Der rote und der violette Farbstoffbildner wurden auf diese Weise je in mehreren Kolonien, der gelbe aber nicht erhalten. Wiederholende Untersuchungen konnten infolge der raschen Fäulnis des Ausgangsmaterials nicht mehr vorgenommen werden. Es handelte sich auch nicht um die Isolierung möglichst vieler Farbstoffproduzenten, sondern um die Entscheidung der prinzipiellen Frage, ob Bakterienpigmente die Färbungen der Eier hervorgerufen hatten. Die verschiedenen Farbnuancen, die sich in allen Abstufungen finden, können ja auf stammeseigentümlichen Varietäten der Bakterien beruhen. Viel wahrscheinlicher aber ist es, daß die konkurrierende Bakterienflora sowohl hinsichtlich der Intensität als der Art der Färbung einen bestimmenden Einfluß

ausübt. Der Grad der Entwicklung, die Verschiedenheit ihrer Stoffwechselprodukte und vor allem Aenderungen der Reaktion werden hier die maßgebenden Faktoren sein.

Die isolierten Bakterienstämme gehören weitverbreiteten und wohlbekannten Gruppen von Farbstoffbildnern an. Es handelt sich um einen Pyocyaneus-, Prodigiosus- und Violaceus-Stamm. Aus dem intensiv blaugrünen Farbstoffgemisch des ersteren geht beim Ausschütteln der Kultur mit Chloroform das stahlblaue Pyocyanin in Lösung. Der Gelatinestich wird sehr rasch, erst trichterförmig, dann zylindrisch verflüssigt. Der Farbstoff älterer Gelatinekulturen geht regelmäßig in ein dunkles Braunrot, später in ein tiefes Schwarzrot über. Die beweglichen Stäbchen sind gramnegativ, die Länge im Kondenswasser einer Schrägagarkultur beträgt nach 24 Std. bis zu 4 μ.

Die Prodigiosus-Kulturen (gramnegative, 1—3 μ lange, dünne Stäbchen) zeigen wechselnde Farbe, vom Purpurrot bis zum leuchtenden Zinnoberrot. Der Farbstoff löst sich leicht in Alkohol mit roter, in Aether schwer mit gelbbräunlicher Farbe. Der Gelatinestich wird sehr rasch, schlauchförmig verflüssigt. Die Farbstoffproduktion im oberen Teil der Verflüssigungszone steht der einen Schrägagarkultur an Intensität nicht nach.

Der violette Farbstoff löst sich in Alkohol, nicht in Aether und Chloroform. Ein Salzsäurezusatz (1:3) entfärbt die alkoholische Lösung, Ammoniak läßt sie unverändert, Alkalizusatz ruft grünblaue Verfärbung hervor. Es bestehen also einige Differenzen zu den Angaben von Lehmann und Neumann (1920) bezüglich des Verhaltens des Janthins Das schlanke, lebhaft bewegliche Stäbchen ist gramlabil, seine Länge im Kondenswasser einer 24stünd. Agarkultur schwankt zwischen 2 und 4 μ. Die Gelatine wird mäßig rasch, schlauchförmig verflüssigt unter flockiger Trübung des Verflüssigungskanals und Ansammlung graugelblicher Bakterienmasse am Grund. Nach oben ist der Verflüssigungsschlauch schalenförmig erweitert. Um die Einstichstelle entwickelt sich die zähschleimige Bakterienmasse langsam in die Breite in Gestalt einer etwas eingesunkenen tiefvioletten Scheibe. Dem helleren Randsaum folgt oft wieder ein violetter konzentrischer Ring, die Einzelkolonie der Gelatineplatte zeigt radiäre Zeichnung und etwas gefaserten Rand. Das Zentrum ist tiefviolett gefärbt und durch ebensolche radiäre Streifen mit einzelnen Farbflocken der Peripherie verbunden. Nach 8 Tagen sind die kreisrunden granulierten Kolonien gleichmäßig dunkelviolett gefärbt und nur mehr von einer schmalen graugelblichen Randzone umsäumt. Ein ganz ähnliches Bild bieten die Agarkolonien, deren Rand etwas unregelmäßiger gestaltet ist.

Leider war es verabsäumt worden, das Verhalten der Farbstoffe des Eiinhalts unmittelbar zu prüfen. In den geschilderten Fällen lagen die Verhältnisse insofern einfach, als die Farben der Reinkulturen mit denen des Eiinhalts Uebereinstimmung zeigten. Da aber die Farbstoffbildung, wie bereits erwähnt, nicht nur quantitativ, sondern auch qualitativ von den verschiedensten Bedingungen beeinflußt wird, kann diese Uebereinstimmung nicht immer erwartet werden. In solchen Fällen kommt der Prüfung der beiden Pigmente unter Umständen eine diagnostische Bedeutung zu, da aus der Identität der Pigmente auf die Identität der Pigmentbildner zu schließen ist.

Unter den abgestorbenen Eiern finden sich farblose und bunte stets durcheinandergewürfelt. Wodurch es den Spaltpilzen ermöglicht wird,

sich im Innern der Eier anzusiedeln, ist vorläufig noch eine offene Frage. Tote Eier unterliegen selbstverständlich der bakteriellen Zersetzung, bei der Infektion lebenstüchtiger Eier muß wohl eine Läsion der schützenden Hülle den Bakterien den Weg ins Innere öffnen. Vielleicht sind Saprolegnien häufig die Schrittmacher der bakteriellen Infektionen. Nach Mitteilung von Herrn Dr. Bayersdörfer wurden in Langenargen auch farbige Eier in Behältern gefunden, die im freien Seewasser ausgesetzt waren. Meist handelte es sich um schwarze Eier. In diesem Fall liegt die Vermutung nahe, daß der bei der Fäulnis sich entwickelnde Schwefelwasserstoff das im Wasser gelöste Eisen als Schwefeleisen niederschlug.

Bei den in Zersetzung begriffenen farbigen Eiern beteiligen sich verschiedene Bakterienarten am Abbau der organischen Substanz. Im Frühstadium scheinen die Farbstoffbildner zu dominieren, mit fortschreitender Fäulnis werden sie zurückgedrängt, putride Keime gewinnen die Oberhand. Von den isolierten Bakterienarten bildet nur Bact. violaceum Schwefelwasserstoff. Infolge der raschen Ueberwucherung und Vernichtung der Farbstoffbildner ist nur solches Material zur Untersuchung geeignet, das sich nicht schon im Zustande der anaëroben Zersetzung befindet und so die Isolierungsmöglichkeit der Pigmentbakterien von vornherein in Frage stellt.

Literatur.

Bonnet, R., Studien zur Physiologie und Pathologie der Fische. (Bayer. Fischereiztg. 1884. S. 206 ff.)

Ueber den Zuckergehalt von Nährmitteln.

[Aus der Universitäts-Frauen-Klinik Erlangen (Direktor: Prof. Dr. Wintz).]

Von **Wilhelm Rother.**

In Frauenkliniken werden Nährlösungen in der Regel aus Plazenten hergestellt. Die Bereitung ist einfach und der Zuckergehalt im Gegensatz zu den aus Pferdefleisch hergestellten Nährmitteln sehr gering. Die Abkochung reagiert stets alkalisch auf Lackmus und sauer auf Phenolphtalein. Es besteht also von Natur aus der Alkalitätsgrad, der die günstigsten Aussichten für das Wachstum der Bakterien bietet (1). Die Untersuchungen in dieser Richtung erstreckten sich auf die Abkochungen von 25 Plazenten. Die Einstellung der Nährmittel, welche die Bereitung am längsten aufhält, fällt damit weg.

Die Nachgeburten werden nach Entfernung der abtragbaren Teile der Eihäute und der Nabelschnur durch die Hackmaschine gedreht, das zweifache Gewicht Wasser zugesetzt und etwa $^1/_2$ Std. gekocht. Es folgt nach Filtration der Abkochung der Zusatz von 1 Proz. Pepton und 0,5 Proz. Kochsalz nochmaliges Aufkochen und Filtration. Die 1. Abkochung ist häufig trüb, doch schwindet diese Trübung bei der 2. Filtration. Bei 25 Plazenten mußte nur 1mal die Klärung durch Zusatz von Speichel erfolgen (2). Dieser kleine Uebelstand fällt

nicht sehr ins Gewicht, da, wie ersichtlich, dieser Fall nur selten eintritt.

Die auf diese Weise hergestellte Nährflüssigkeit wurde mit Bacterium coli beimpft und nach 24 Std. die in 10 ccm aus dem vorhandenen Zucker gebildete Säure mit $n/_{10}$ Natronlauge titriert (Indikator Phenolphtalein). Jede Untersuchungsreihe bestand aus 3 Röhrchen: I. Unbeimpfte Kontrolle, II. Beimpft mit Bact. coli, III. Beimpft mit Bact. coli (Zusatz 1 Proz. Traubenzucker). Aus der Tabelle 1 ist ersichtlich, daß der Unterschied der Titrationswerte

Tabelle I.

Plazenta	I	II	III
1	0,6	0,8	3,0
2	0,8	1,0	3,1
3	0,9	1,0	3,2
4	0,8	1,0	3,3
5	1,4	1,6	4,2
6	0,7	1,1	3,2
7	0,9	1,3	3.1
8	0,8	1,2	3,0

zwischen I und II sehr gering ist und diese nur in kleinen Grenzen schwanken. Rötung von Lackmuspapier wurde in keinem Falle erreicht.

Tabelle II.

Plazenta	I	II	III
9	1,0	1,5	3,8
10	0.7	1,1	3,0
11	0,6	1,0	3,2
12	0,8	1,1	4,3
13	0,9	1,3	3,3
14	0,6	0,9	3,0
15	1,2	1,4	4,1
16	0,7	1,0	3,5

Tabelle II zeigt die Ergebnisse mit der gleichen Methodik bei Nährlösungen, die aus Nachgeburten durch Verdauung mit Pankreatin gewonnen wurden. Die gekochte Plazentamasse + 1. Abkochung wurden 2 Tage bei 37° durch Pankreatin (ohne weitere Alkalisierung) unter Chloroformzusatz verdaut. Die filtrierte Verdauungsbrühe wurde mit der gleichen Menge Wasser verdünnt und 0,5 Proz. Kochsalz zugesetzt. Wie aus der Tabelle ersichtlich, war die Säuerung etwa die gleiche wie bei der Peptonnährlösung. Da jedoch mit einer Verdünnung der Stammlösung wie üblich gearbeitet wurde, ist der Zuckergehalt ursprünglich höher. Die Ursache ist das in Spuren vorhandene Glykogen, das durch Pankreatin in vergärungsfähigen Zucker übergeführt wurde (3).

Abkochungen von Pferdefleisch zeigen ein ganz abweichendes Verhalten. Sie geben stets auf Lackmus sauere Reaktion und müssen deshalb alkalisiert werden. Außerdem enthalten sie Zucker in grö-

ßeren Mengen. Ist viel Glykogen vorhanden, das die meisten Bakterien nicht verarbeiten können, so kann der Gehalt an abbaufähigem Zucker relativ klein sein. Dessen Menge nimmt jedoch wesentlich zu, wenn die tierische Stärke durch ein Ferment verändert wird. Die Alkalisierung wurde so vorgenommen, daß 10 ccm Nährlösung 0,8 ccm $n/_{10}$ Normalnatronlauge bis zum Phenolphtaleinpunkt benötigten (Tab. III), zeigt die Titrationswerte vor (a) und nach (b) Abbau des Glykogens. Dieser erfolgte durch Zusatz von Pankreatin (2stünd. Verweilen im Brutschrank). Nach Filtration wurde die Glykogenprobe mit Lugolscher Lösung vorgenommen. Falls diese negativ ausfiel, erfolgte nach erneuter Sterilisation die Beimpfung.

Tabelle III.

Pferdefleisch	a)			b)		
	I	II	III	I	II	III
1	0,8	1,9	4,0	0,8	2,2	4,1
2	0,8	1,6	3,9	0,8	2,2	4,1
3	0,8	1,5	4,1	0,8	1,8	4,0
4	0,8	2,2	4,2	0,8	2,3	4,1
5	0,8	2,4	4,0	0,8	3,0	4,2
6	0,8	2,0	3,9	0,8	2,1	4,0
7	0,8	2,5	4,0	0,8	3,0	4,1
8	0,8	1,9	3,9	0,8	3,1	4,0

Aus Tabelle III geht hervor, daß bei Pferdefleisch mit einem großen Zuckergehalt zu rechnen ist. Die Differenz der Säurewerte ist wesentlich höher als bei Nährlösungen aus Plazenten, besonders aber nach Abbau des Glykogens.

Es ist deshalb nicht zu verwundern, wenn säureempfindliche Bakterien bei Verwendung von Pferdefleischnährmitteln ohne Zuckerzusatz schon in der 1. Generation absterben. Zusatz von Serum oder Aszites kann den Gehalt an abbaufähigem Zucker und damit die Säuerung vermehren, weil beide durch das in ihnen enthaltene Ferment das Glykogen abbauen.

Aus Blutkuchen bereitete Nährmittel konnten nur in 1 Falle untersucht werden (4). Es wurde Blut verwendet, das durch Aderlaß bei einer Eklampsie gewonnen wurde. Der Blutkuchen wurde wie die Plazenten auf 2 Weisen verarbeitet (Tabelle IV und V). Es schoint

Tabelle IV.

Blutkuchen (Pepton)	I	II	III
	0,9	1,0	2,7

Tabelle V.

Blutkuchen (Pankreatin)	I	II	III
	1,2	1,6	2,5

sich um ähnliche Verhältnisse wie bei Plazenten zu handeln. Wahrscheinlich ist der Zuckergehalt im Durchschnitt noch geringer, da sich das Serum leicht vom Blutkuchen trennen läßt.

Zusammenfassung.

Nährlösungen aus Plazenten haben geringen Zuckergehalt im Gegensatz zu Nährlösungen aus Pferdefleisch. Da bei den erstgenannten von Natur aus die Reaktion für Lackmus alkalisch und für Phenolphtalein sauer ist, fällt die Alkalisierung weg.

Literaturverzeichnis.

1. L. Heim, Lehrbuch der Bakteriologie, 6. Auflage. — 2. W. Rother, Ueber Klärung von Nährbrühe mit Speichel. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 90. 1923. S. 20.) — 3. W Rother, Ueber den Glykogengehalt von Nährmitteln. (Ebenda Bd. 88. 1922. S. 560.) — 4. M. Knorr, Beiträge zu bakteriol. Kulturmethoden. (Ebenda Bd 86. 1921. S. 596.)

Druckfehlerberichtigung.

In der Arbeit Fritz v. Gutfeld und Edith Weigert, „Zur Serodiagnostik der Tuberkulose mittels Komplementbindung“ in diesem Centralblatt ist auf S. 442 hinter dem vorletzten Absatz einzufügen „Tabelle VII“ und auf S. 443 nach der Literatur „Manuskript bei der Redaktion eingegangen im August 1924“.

Inhalt.

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena. — 5294

Centralbl. f. Bakt. etc. I. Abt. Originale. Bd. 94. Heft 2.

Ausgegeben am 28. Januar 1925.

Der Bacillus histolyticus (Weinberg und Séguin).

[Aus dem bakteriologischen Untersuchungsamt der Stadt Altona an der Elbe (Dr. Zeißler).]

Von Dr. **H. Chiari.**

Mit 2 Tafeln.

In Band II des Handbuches der mikrobiologischen Technik von Kraus und Uhlenhuth gibt Zeißler (4, 5) eine Aufstellung der von ihm bis 1923 gezüchteten Anaërobier. In dieser Tabelle fehlen jedoch einige der Arten, die von den französischen Forschern Weinberg und Séguin (1) beschrieben worden sind. Die Bearbeitung mehrerer Erdproben, die auf ihren Gehalt an anaëroben Keimen untersucht wurden, ermoglichte es, die Zeißlerschen Ausführungen in dieser Hinsicht zu ergänzen und die Mitteilungen Weinbergs und Séguins zunächst für einen der von ihnen gefundenen Mikroorganismen, den Bacillus histolyticus, zu bestätigen.

Der Bac. histolyticus erhielt seinen Namen wegen seiner Fähigkeit, das Gewebe bis zur völligen Auflösung zu zerstören. Die Autoren fanden den Keim in 8 Fällen von Kriegsverletzungen neben anderen Anaërobiern beim Menschen. Als einziger Erreger kam er nie vor. Auch in dem von Legros und Vaucher beobachteten Falle war er mit dem Bac. oedématiens (dem Novyschen Bazillus des malignen Oedems) vergesellschaftet. Von englischer Seite (3) wurde der Bac. histolyticus gleichfalls als Erreger schwerer Wundinfektionen während des Krieges gefunden und auch aus der Erde gezüchtet. Das Verhalten des Bac. histolyticus auf der Traubenzuckerblutagarplatte (4, 5) wurde von Zeißler an einem ihm von Dr. Sordelli (Buenos Aires) übersandten Originalstamm des Institut Pasteur sowie an 3 von Sordelli reingezüchteten Stämmen festgestellt. In Deutschland wurde er dann zum 1. Male aus der Aescherbrühe einer Lederfabrik sowie aus verschiedenen Erdproben isoliert, welche auf Veranlassung von Aschoff während des Krieges an den verschiedenen Fronten gesammelt worden waren (Zeißler und Raßfeld, sowie Verfasser).

Der Bac. histolyticus zeigte dabei folgende Eigenschaften: Er ist kleiner als die meisten anaëroben Bazillen, besitzt, wie schon Weinberg und Séguin angeben, abgerundete Enden (Fig 1), verhält sich der Gram-Färbung gegenüber positiv, ist durch peritriche Geißeln lebhaft beweglich und bildet end- bis mittelständige, den Bazillenleib auftreibende Sporen. In älteren Kulturen finden sich oft Blähformen (Fig. 2).

Traubenzuckerblutagarplatte: rund — asbestflockenartig — wurzelförmig, Kolonien sehr klein: Miniaturform von IIa, sind tief in den Nährboden eingesunken, farblos — zart grau hämolytischer Hof, geruchlos, langsam wachsend. Wäre in der von Zeißler

angegebenen Tabelle als Wuchsform VIII zu führen (Fig. 3). Sie ist spezifisch für den Bac. histolyticus.

Milch: wird peptonisiert in 1—2 Tagen (×). Gelatine: wird verflüssigt in 1—2 Tagen, dabei dichte Trübung des Nährmediums infolge des reichlichen Wachstums (×). Hirnbrei: langsame Schwärzung, beginnend am 2.—3. Tag, allmählich zunehmend. Resistenz der Sporen gegen Siedehitze: meist 60'—90', jedenfalls über 40' (+++).

Der Bac. histolyticus ist pathogen für das Meerschweinchen, das Kaninchen, die Maus und die Ratte, für letztere am wenigsten. Bei intravenöser Injektion von einer 12stünd. Bouillonkultur stirbt das Tier innerhalb weniger Min., als einziges Zeichen eine Hyperämie der Bauchorgane bietend. Nach intraperitonealer Einspritzung findet sich dasselbe Bild, vergesellschaftet mit einem hämorrhagischen Exsudat in der Bauchhöhle. Die subkutane Injektion führt so rasch zu einer Auflösung der darüber liegenden Haut, daß das Tier meist überlebt und die entstandene Wunde verschorft. Erfolgt jedoch die Injektion intramuskulär, so schwillt nach wenigen Std. die betreffende Extremität stark an, die Haut wird blaurot, zerreißt nach einiger Zeit und läßt die der völligen Auflösung verfallenen Muskel- und Bindegewebereste frei zu Tage liegen. Meist schreitet die Histolyse so rasch fort, daß nach 12—16 Std. nur mehr der bloße Knochen übrig geblieben ist. Oft tritt auch eine „Spontanamputation" im Kniegelenk ein. Infiziert man sehr reichlich, so kann die Bauchhöhle eröffnet werden und Darm austreten. (Krankheitsbild VI „Histolyse") Gasentwicklung fehlt (Fig. 4).

Die gewebeauflösende Fähigkeit des Bac. histolyticus scheint an ein von dem Mikroorganismus gebildetes Toxin gebunden zu sein, da nach Weinberg und Séguin das Filtrat nicht zu alter Kulturen sowohl in vitro wie in vivo Eiweiß verflüssigt.

Das Wachstum des Bac. histolyticus auf der Traubenzuckerblutagarplatte in einer für ihn spezifischen Wuchsform (Wuchsform VIII, vgl. oben) erleichtert seine Auffindung, Isolierung und Artbestimmung sehr und ist ein neuer Beleg für den Wert der Oberflächenzüchtung der anaëroben Bazillen auf der Blutplatte.

Literatur.

1) Weinberg et Séguin, La gangrène gazeuse. Paris (Masson) 1917. p. 165, 1. — 2) Legro et Vaucher, cit. d'après Weinberg et Séguin. — 3) Medical Research Committee, Report on the anaërobic infections of wounds and the bacteriological and serological problem against therefrom. London 1919. — 4) Zeißler, Kraus-Uhlenhuth, Hdb. d. mikrobiol. Techn. Berlin-Wien (Urban u. Schwarzenberg) 1923. — 5) Zeißler, Klin. Woch. 1923.

Erläuterung der Abbildungen.

Fig. 1. 24stünd. Leberbouillonkultur. 1000 : 1.
Fig. 2. 4täg. Leberbouillonkultur. 1000 : 1.
Fig. 3. 20stünd. Traubenzuckerblutagarplattenkultur. 25 : 1.
Fig. 4. 20 Std. nach intramuskulärer Einspritzung von 0,5 ccm einer 40-stünd. Leberbouillonkultur in den linken Unterschenkel.

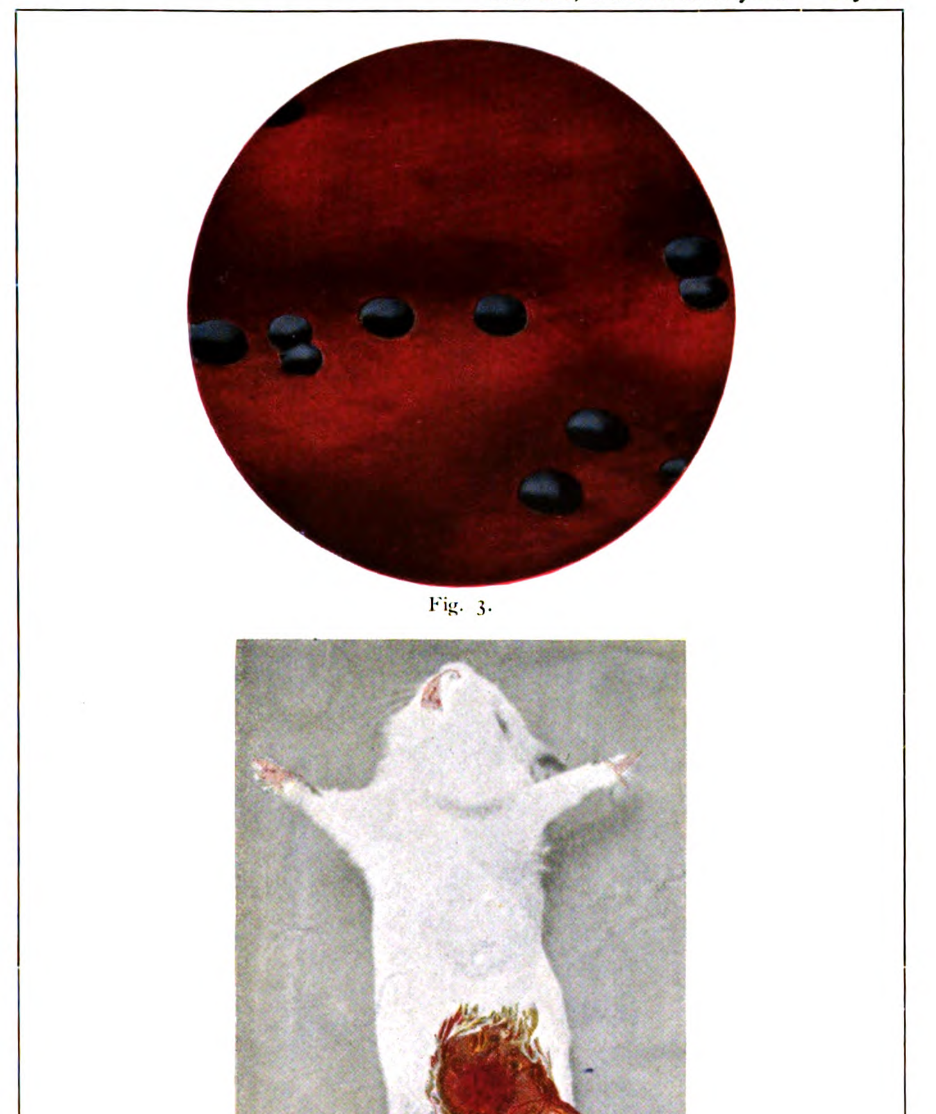
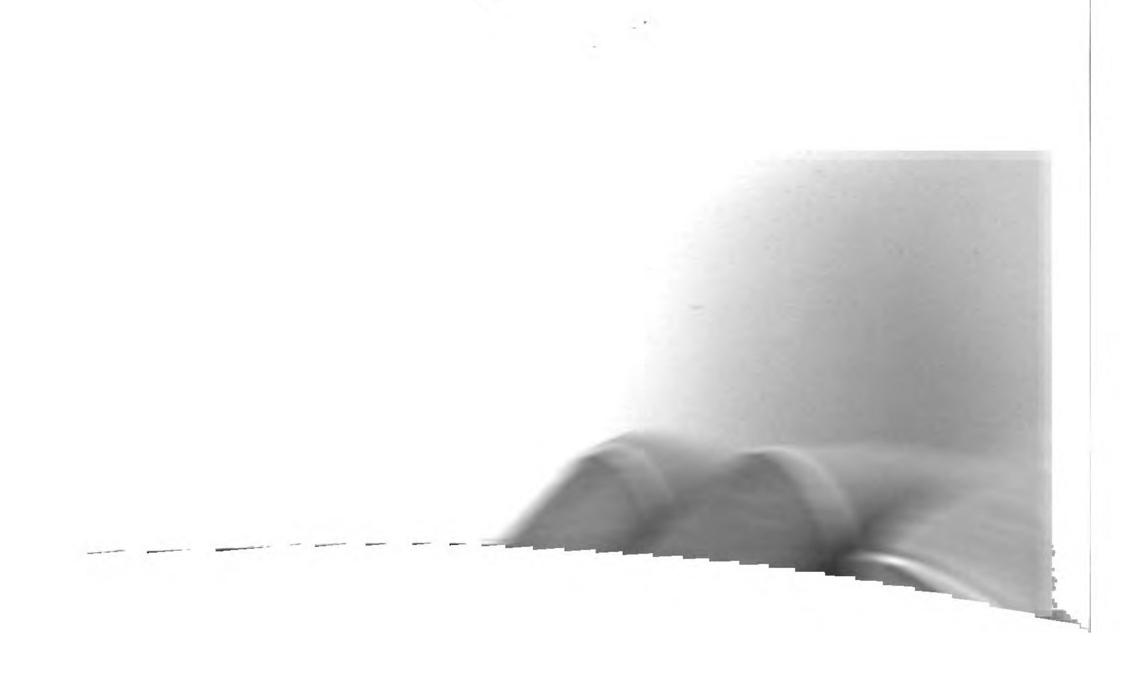


Fig. 3.

Fig. 4.

Verlag von Gustav Fischer in Jena.



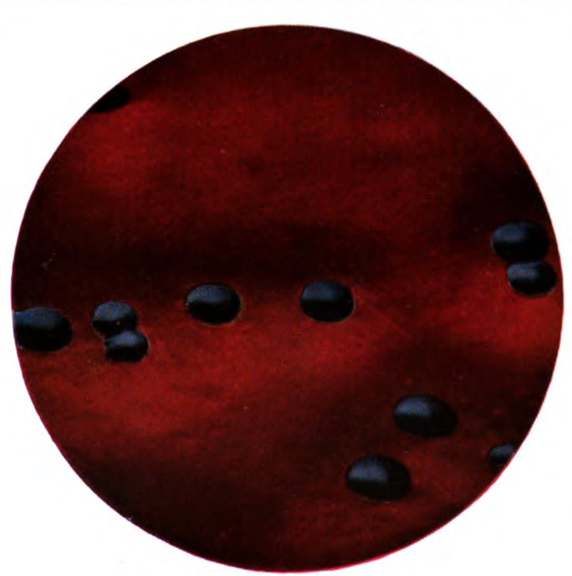
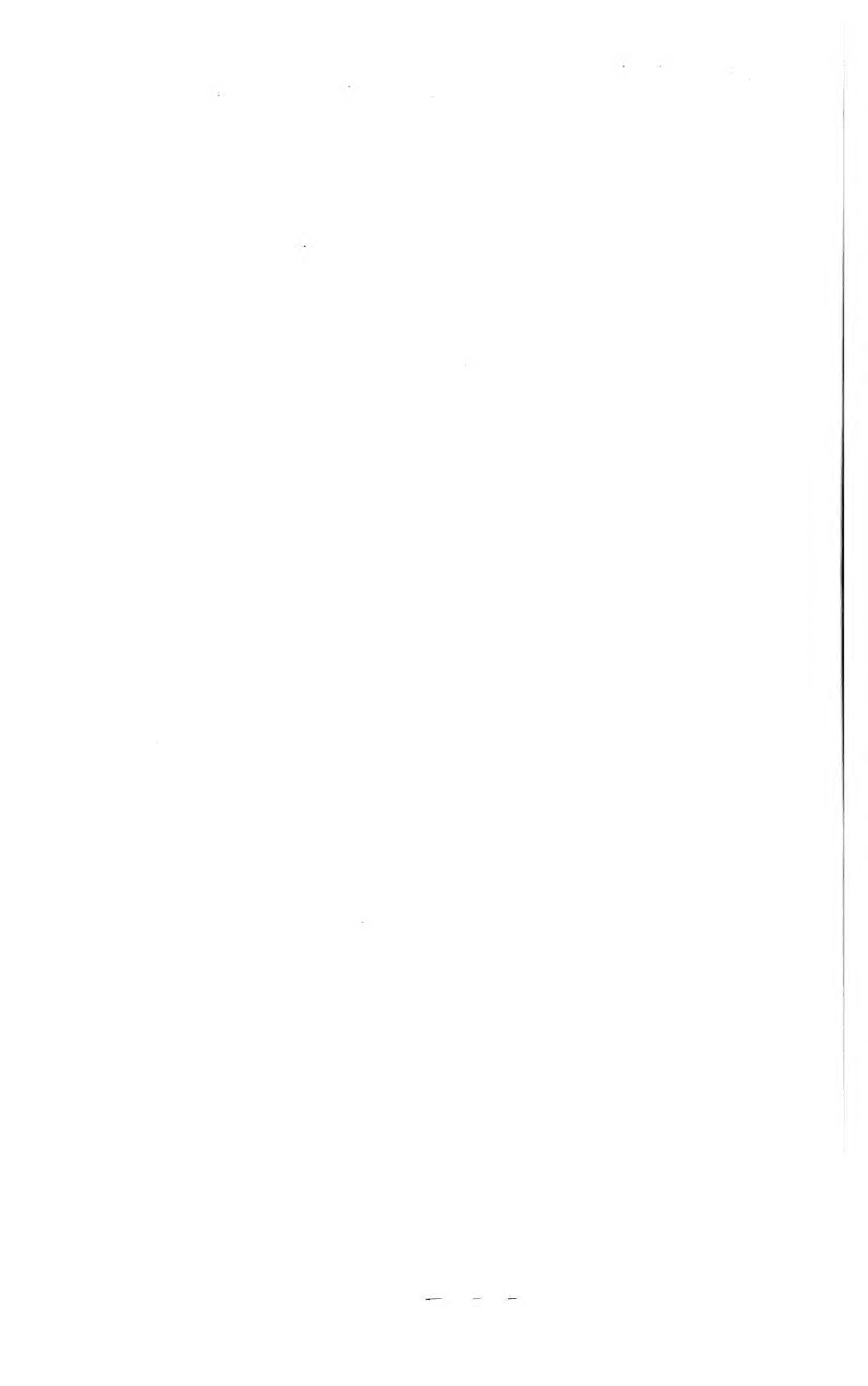


Fig. 3.



Verlag von Gu[illegible]ena.



Beobachtungen bei Erkrankungen durch Paratyphus B (Schottmüller)-Bazillen und durch Fleischvergifter (Breslau-Bazillen).

Von Dr. **Hage**,
früher Leiter der Bakteriol. Unters.-Anstalt für die Typhusbekämpfung beim Hygienischen Institut der Universität Jena.

Mit 4 Abbildungen im Text.

II. Teil.

Bakteriologisches.

Bei den gezüchteten Paratyphus B-Stämmen wurde besonders auf die Wallbildung geachtet, die isolierte und größere Kolonien einer 24stünd. Paratyphus B-Kultur zeigen, nachdem dieselbe weitere 24 Std. bei Zimmertemperatur gehalten worden ist, einen als „Schleimwall" bezeichneten, radiär gestreiften Saum, der auf Bildung einer schleimigen Interzellularsubstanz zurückzuführen ist [Baumgärtel][1]). Bei 10-facher Lupenvergrößerung im durchfallenden Licht stellt er sich als heller, milchig-glasiger, feucht glänzender, radiär fein gestreifter Ring dar [Trawiński[2])], von den meisten Untersuchern [Bitter[3]), Wolf Gärtner[4]), Trawinski[2]) u. a.] wird er für äußerst charakteristisch für den Paratyphus B (Schottmüller)-Bazillus gehalten, während Holm und Lewy[5]) das Wallbildungsphänomen noch bei keinem echten Paratyphus B-Stamm deutlich gesehen haben wollen. Bei den meisten der von mir gezüchteten Stämme konnte die typische Wallbildung beobachtet werden, nur in 1 Falle ging sie bald verloren und in einem 2. Falle war sie anfänglich nicht so üppig wie sonst, konnte aber bei Lupenvergrößerung doch deutlich festgestellt werden. Eine Ausnahme der Wallbildung machen aber folgende Beobachtungen: Aus dem Stuhl einer während einer kleinen Epidemie Erkrankten wurden Paratyphus B-Bazillen gezüchtet, die gute Schleimwälle bildeten. Der Stamm wurde weitergezüchtet, und auf einer mittelgroßen Endo-Platte standen gut isoliert 54 Kolonien, die sämtlich gute Wälle bildeten, nur eine einzige Kolonie bildete keinen Wall, sie tat dies auch bei weiteren Uebertragungen nicht.

Aus dem Blute einer Kranken, die in der gleichen Epidemie erkrankte, wurden wallose Kolonien gezüchtet, während sie im Stuhl sehr gute Wallbildner aufwies. (Auf diesen Fall wird bei dem Tierversuch noch eingegangen.)

Ein aus dem Stuhl einer an Fleischvergiftung Erkrankten gezüchteter typischer Breslau-Stamm zeigte nach 3 Tagen Zimmertemperatur kleine Wälle mit deutlicher radiärer Streifung. Diese Wallbildung verlor sich aber bei weiterer Züchtung, wie dies auch Bitter (l. c.) in 1 Falle beobachtet hat.

1) Zeitschr. f. Hyg. Bd. 94. Heft. 2/3.
2) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 90. Heft 1.
3) Ibid. Bd. 88. Heft 6 u. a. O.
4) Ibid. Bd. 87. Heft 7/8.
5) Zeitschr. f. Hyg. Bd. 96.

Ein aus dem Stuhl einer an Gastroenteritis für 3 Tage erkrankten Patientin gezüchteter Stamm bildete anfänglich Wälle, später nicht mehr, im Tierversuch erwies er sich als Breslau-Bazillus.

Eine besonders beachtenswerte Beobachtung ist die folgende: Aus dem Stuhl eines unter besonders schweren typhösen Erscheinungen erkrankten 2jährigen Kindes wurden aus dem Blute und dem Stuhle echte wallbildende Paratyphus B-Bazillen gezüchtet (Fig. 1). Als von der Malachitgrünplatte auf Endo übergeimpft wurde (Punkt und Strich) zur Beobachtung der Wallbildung, fand sich zunächst keine Wallbildung, am 3. Tage aber waren deutlich von der Mitte her ziehende, geschlängelte Streifen bei Lupenvergrößerung zu sehen, die sich am Rand zu schleimigen Partien verdichteten (Fig. 2 u. 2a). Es wurde nun sowohl von dem glatten Rande als auch von den schleimigen Teilen abgeimpft und folgendes (Fig. 3 u. 4) erzielt: Während die schleimigen Teile nur wieder wallbildende Kolonien ergaben, wuchs der von dem glatten Rande abgeimpfte Punkt zunächst wieder glattrandig, nach

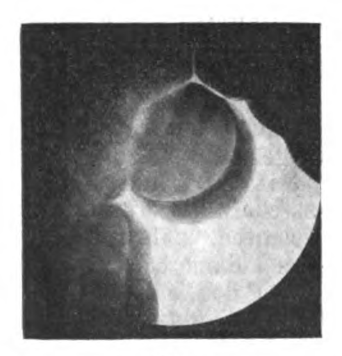


Fig. 1.



Fig. 2.



Fig. 2a.

Fig. 1. Kolonie mit guter Schleimwallbildung. 3 Tage alt. Vergr. 1:15. Aufgenommen mit photograph. Okular nach Siedentopf von Frl. Lüttich-Jena.

Fig. 2 und 2a. Kolonien mit glattem Rande. Am 3. Tage von der Mitte her ziehende geschlängelte Streifen, die sich am Rande zu Schleimwällen verdichteten.

8 Tagen zeigten sich auf ihm aber Knöpfe. Wurde von diesen abgeimpft, zeigten sich nur wallbildende Kolonien, dagegen ergab der glattrandige Teil teils wallbildende, teils wallose Kolonien, und zwar standen die wallbildenden mitten unter den wallosen Kolonien, während sonst auch bei guten Wallbildnern auf der Mitte der Platte (dicht stehende Kolonien) keine Schleimwallbildung auftritt, sondern sich nur bei den gut isolierten oder peripheren Kolonien zeigt. Bei der Weiterimpfung traten immer wieder teils wallose, teils wallbildende Kolonien auf. Im Tierversuch und im Absättigungsversuch verhielten aber die wallosen Kolonien sich wie echte Paratyphus B (Schottmüller)-Bazillen, während im einfachen Agglutinationsversuch die wallosen zwar von einem B-Immunserum ebenso wie die wallbildenden bis über die Titergrenze hinaus agglutiniert wurden, dagegen von einem mit einem Breslau-Stamm hergestellten Immunserum deutlich besser agglutiniert wurden als die wallbildenden Kolonien.

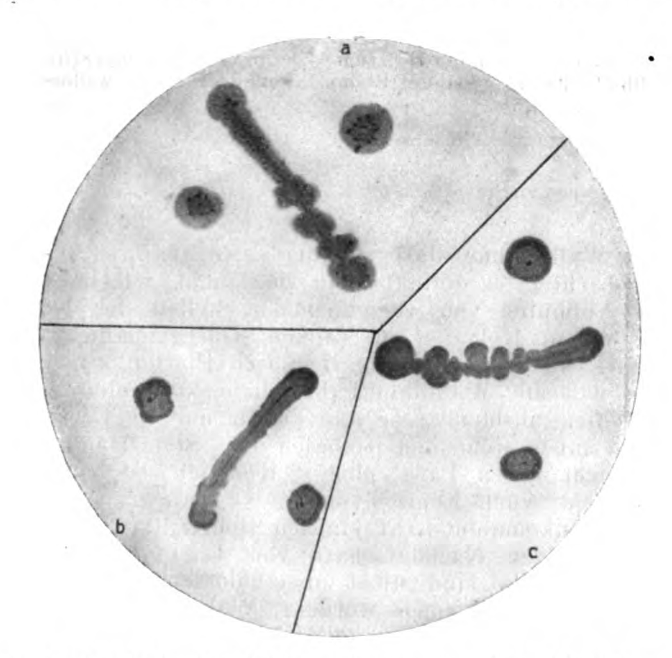


Fig. 3. In durchfallendem Lichte aufgenommen. 8täg. Wachstum. a Wallose glattrandige Kolonien mit knopfförmigen Auflagerungen, abgeimpft vom glatten Rande der Kolonie 2; b wallbildende Kolonien, abgeimpft von den schleimigen Partien von Kolonie 2; c wallbildende Kolonien, abgeimpft von Kolonie 1.

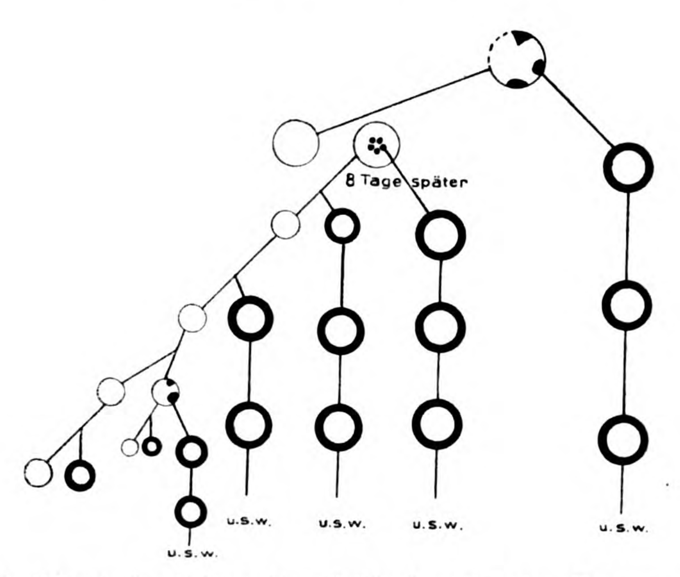


Fig. 4. Schema der Spaltung in wallbildende und wallose Kolonien, abgeimpft von Kolonie 2.

Einfacher Agglutinationsversuch:

	a) mit echtem Paratyphus B-Serum		b) mit Fleischvergifterserum	
	wallbild. Stamm	walloser Stamm	wallbild. Stamm	walloser Stamm
1 : 1000	+	+	+	+
1 : 2000	+	+	±	+
1 : 4000	+	+	—	+
1 : 8000	+	+	—	—
1 : 16 000	+	+	—	—
1 : 32 000	+	+	—	—

Daß die Wallbildung unregelmäßig oder sektorenförmig erfolgt, wird öfter beobachtet; es gelingt dann aber nicht, wie im vorliegenden Falle, durch Abimpfen von verschiedenen Stellen der Kolonie wallbildende und wallose Kolonien zu erzielen. Unregelmäßige Wallbildung wird z. B. auf sehr dünn gegossenen Endo-Platten erzielt. Erwähnt wurde schon, daß die Wallbildung bei dicht stehenden echten Paratyphus B-Kolonien ausbleibt; sie tritt dann nur in Form von Halbmonden an den außen stehenden Kolonien auf. Stehen andere Kolonien, z. B. Coli, dicht neben Paratyphus B-Kolonien, so bleibt die Wallbildung nicht aus. Auch wenn Typhus-, Suipestifer-, Paratyphus A-, Staphylokokkenkolonien dicht daneben stehen, tritt Wallbildung ein, dagegen nicht in der Nachbarschaft von Gärtner- und Breslau-Bazillen. Die Versuche sind nicht abgeschlossen und sollen bei Gelegenheit wieder aufgenommen werden. Wahrscheinlich sind es bestimmte Stoffwechselprodukte, die an den Nährboden abgegeben werden, die die Wallbildung verhindern. Wenn man z. B. eine Endo-Platte in der einen Hälfte dicht mit Paratyphus B-Kolonien beimpft, die andere Hälfte ebenso dicht, aber den Nährboden durch tiefe Schnitte um die einzelnen Kolonien durchtrennt, so daß wirkliche Spalträume entstehen, bleibt auf der 1. Hälfte die Wallbildung aus, bei der 2. Hälfte dagegen tritt sie auf.

Wir sehen somit, daß die Wallbildung ein gutes, wenn auch nicht untrügliches diagnostisches Hilfsmittel ist, um den Erreger der typhösen Form des Paratyphus B, den Bacillus paratyphi B. Schottmüller festzustellen.

Ein weiteres diagnostisches Hilfsmittel ist der Tierversuch. Mit wallbildenden Paratyphus B-Stämmen gefütterte weiße Mäuse bleiben gesund. Bei zahlreichen Verfütterungen konnte dies wieder festgestellt werden. Um zu sehen, wie sich die Ausscheidung bei den Tieren gestaltete und ob möglicherweise eine dauernde Ansiedelung der Bazillen im Tierkörper erfolgt, sind bei einer Reihe von gefütterten Mäusen täglich Stuhlproben untersucht. In allen Fällen zeigte sich eine mehr oder weniger schnelle, immer aber eine fortschreitende Abnahme der Keime. Die längste Zeit der Ausscheidung betrug 17, die kürzeste 4 Tage. Die Stuhlproben der Mäuse wurden 21 Tage lang täglich untersucht, dann bis zu 5 Wochen noch verschiedentlich mehrere Tage hintereinander, niemals wurde mehr eine Ausscheidung von Paratyphus B-Bazillen gefunden.

Eine Ausnahme bildet folgende Beobachtung:

Ein aus dem Stuhle einer Bazillenträgerin gezüchteter Stamm mit sehr guter Wallbildung tötete die gefütterte Maus am 3. Tage. Aus ihrem Herzblut und der Milz wurden wieder Paratyphus B-Bazillen mit guter Wallbildung gezüchtet. Eine zweite mit demselben Stamm gefütterte Maus blieb gesund, ebenso eine weitere, die mit dem Stamm aus der gestorbenen Maus gefüttert war.

Es ergibt sich hieraus, daß eine weiße Maus auch an der Verfütterung mit einem echten B-Stamm sterben kann und daß auch die echten Paratyphus B-Bazillen dann bei ihr im Herzblut und der Milz als Zeichen einer Allgemeininfektion gefunden werden können. Daher ist es nötig, sich nicht nur mit der Feststellung des Todes der Maus und dem Vorhandensein von Paratyphus B-Bazillen im Herzblut zu begnügen, sondern auch zu prüfen, ob es sich nicht doch um einen wallbildenden Stamm handelt. Der Tierversuch erleidet hierdurch nur eine gewisse Einschränkung. Die Wichtigkeit des Mäusefütterungsversuches mag durch folgende Beobachtungen erwiesen sein:

1. Aus der Gallenblase einer auswärts an Arteriosklerose und Brechdurchfall gestorbenen Patientin wurde ein Paratyphus B-Stamm gezüchtet, der gute Wälle bildete. Die gefütterte Maus starb am 5. Tage. Aus dem Herzblut, der Milz und dem Darm wurden Paratyphus B-Bazillen ohne Wallbildung gezüchtet. Eine mit diesem Mäusestamm gefütterte Maus starb am 3. Tage nach der Fütterung, bei ihr wurden ebenfalls nur wallose Kolonien aus Herzblut, Milz und Darm isoliert.

2. Ein aus dem Stuhle eines unter Erbrechen, Durchfall und krampfartigen Leibschmerzen erkrankten Patienten gezüchteter Stamm bildete gute Wälle, ebenso wie ein 14 Tage zuvor isolierter Stuhlstamm des gleichen Patienten. Die mit diesem gefütterte Maus starb am 7. Tage, aus Herzblut, Milz und Darm wurden Paratyphus B-Bazillen gezüchtet, die sämtlich keine Wälle bildeten.

3. Ein aus dem Stuhl einer an Gastroenteritis nach Genuß von verdorbenem Hackfleisch für 3 Tage erkrankten Patientin isolierter Stamm bildete anfänglich gute Wälle. 2 weiße Mäuse wurden mit ihm gefüttert, beide starben, die eine am 7., die andere am 9. Tage. Aus Herzblut, Milz und Darm wurden bei beiden Tieren Paratyphus B-Bazillen gezüchtet, die keine Wälle bildeten.

Bei diesen 3 Fällen besteht die Möglichkeit aus den klinischen Anzeichen (Brechdurchfall, kurze Krankheitsdauer), daß es sich um eine durch einen Breslau-Bazillus hervorgerufene Erkrankung handelt. Hier hätte also der Tierversuch (Tötung der Tiere, Züchtung walloser Kolonien aus inneren Organen) entschieden, daß es sich trotz der anfänglich guten Schleimwallbildung nicht um echten Paratyphus B, sondern um Breslau-Stämme handelt. Olitzki (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 88. H. 6) fand Tierpathogenität bei 2 seiner Stämme, die er als „Uebergangsstämme" bezeichnet, diese Stämme bildeten Wälle. O. sagt nichts darüber aus, ob die verfütterten Wallbildner nach der Tierpassage nun weiter Wälle bildeten oder, wie es meine Stämme taten, diese Eigenschaft verloren hatten.

Das umgekehrte Verhalten sollen 3 weitere Beobachtungen zeigen.

1. Eine weiße Maus wurde mit einem Stamme gefüttert, der als einzige Kolonie ohne Wall mitten in einer Reinkultur von wallbildenden Kolonien stand. Die Reinkultur war aus dem Stuhl einer an der typhösen Form des Paratyphus B leidenden Frau isoliert. Die Maus blieb gesund. Sie schied anfänglich reichlich, dann spärlich Paratyphus B-Bazillen aus, die keine Wälle bildeten. Am 8. Tage nach der Fütterung waren auf der Stuhlplatte nur 3 Kolonien zu sehen, die sämtlich sehr gute Wallbildung zeigten und dieses Vermögen auch beibehielten. Leider hörte mit diesem Tage die Ausscheidung von Paratyphus B-Bazillen bei der Maus völlig auf und trat auch trotz zahlreicher Nachuntersuchungen in den nächsten Tagen nicht wieder auf.

2. Aus dem Blut einer an der typhösen Form des Paratyphus B leidenden Kranken wurde ein Paratyphus B-Stamm isoliert, der keine Wälle bildete. Im Stuhl dieser Kranken wurden 2mal Paratyphus B-Bazillen mit guter Wallbildung festgestellt. (Daß die fehlende Wallbildung in diesem Falle nicht etwa auf den Nährboden geschoben werden kann, geht daraus hervor, daß auf der gleichen, geteilten Platte ein sehr guter Wallbildner wuchs. Es sei an dieser Stelle bemerkt, daß keine Wälle bildende Stämme stets noch einmal auf eine geteilte Platte gebracht wurden, auf deren eine Hälfte ein guter Wallbildner verimpft wurde.)

Die gefütterte Maus blieb gesund, sie schied 8 Tage Paratyphus B-Bazillen aus, dann hörte die Ausscheidung gänzlich auf (Untersuchung 3 Wochen lang). Die ausgeschiedenen Bazillen zeigten keine Wallbildung.

3. Aus dem Stuhl eines 2jährigen Knaben, der an der typhösen Form des Paratyphus B litt, wurden aus dem Blut und dem Stuhle echte wallbildende Paratyphus B-Bazillen gezüchtet. Aus dem Stuhlstamm bildete sich eine Abart, die keine Wälle bildete. Die mit diesem Stamm gefütterte Maus blieb gesund, sie schied 12 Tage lang Paratyphus B-Bazillen aus, von denen ein Teil Wälle bildete, ein anderer nicht.

Wir konnten also in diesen 3 Beobachtungen feststellen, daß es sich um echte Paratyphus B-Bazillen trotz fehlender Wallbildung bei frischer Isolierung aus dem erkrankten Körper handelte. Beachtenswert ist, daß bei den von dem einen Tiere ausgeschiedenen Bazillen die Wallbildung wieder auftrat.

Die Feststellung, daß im Blut eines Kranken, der im Stuhl gute Wallbildner gezeigt hatte, wallose Paratyphus B-Bazillen gefunden werden können, wurde schon einmal gemacht. Es waren von auswärts 2 von einem Kranken gezüchtete Paratyphus B-Stämme eingeschickt, der aus dem Blut gezüchtete Stamm bildete keine Wälle, der Stuhlstamm dagegen sehr gute Wälle. Hier verlief der Fütterungsversuch aber ganz anders als der in Beobachtung 1. Der Stuhlstamm ließ die Maus am Leben, der Blutstamm tötete sie am 8. Tage, aus dem Herzblut und der Milz wurden weiter wallose Kolonien gewoonnen. Wir müssen in diesem Falle eine Doppelinfektion mit einem echten Paratyphus B und einem Breslau-Stamm annehmen.

Fleischvergiftungen.

Durch Breslau-Stämme hervorgerufene Fleischvergiftungen wurden nur selten seitens der Anstalt beobachtet, es mag dies mit daher kommen, daß bei leichteren Störungen kein Material eingesandt wurde.

Im Jahre 1921 wurden nur 2 Fälle festgestellt, im 1. handelte es sich um einen Mann, der Pferdewurst gegessen hatte, nach deren Genuß auch zahlreiche, nicht im Bereich der Anstalt wohnende Menschen erkrankt waren. Aus dem Stuhl und dem Harn dieser Kranken wurden ebenso wie aus der Pferdewurst Breslau-Bazillen gezüchtet.

Im 2. Fall war ein Mädchen an Brechdurchfall erkrankt, das infizierende Nahrungsmittel war nicht festzustellen, im Stuhl fanden sich Breslau-Bazillen.

1922 erkrankte eine Frau an Gastroenteritis für 3 Tage nach Genuß von verdorbenem Hackfleisch, im Stuhle wurden Breslau-Bazillen nachgewiesen.

1923 kamen in Jena 2 kleinere Epidemien vor, die von Schlachtprodukten desselben Roßschlächters ausgingen. Die 1. wurde durch Pferdewurst (sog. Knackwurst, die nicht gekocht wird) hervorgerufen. Das Pferd hatte bei der Schlachtung tierärztlich zu keiner Beanstandung Veranlassung gegeben. Nach Auftreten der Erkrankungen wurden im Tierseucheninstitut in Jena aus dem Fleisch, in der Anstalt Jena aus der Wurst und den Stühlen von 3 Kranken Breslau-Bazillen gezüchtet. Die isolierten Stämme wurden durch ein Breslau-Immunserum bis zum Endtiter (1:4000) agglutiniert, während ein Paratyphus B-Immunserum sie unbeeinflußt ließ. Nach 24 Std. Zimmertemperatur wurden die Stämme durch das Breslau-Immunserum bis 1:8000 deutlich agglutiniert, durch das Paratyphus-B-Serum nur 1:1000 (Titer 1:10000). Im Jenaer Tierseuchen-Institut war der aus dem Fleisch gezüchtete Stamm durch die dortigen Paratyphus B-Immunseren ebenfalls nicht agglutiniert und deshalb zunächst nicht als Paratyphus anerkannt.

Zur Untersuchung gelangten Proben von 9 Personen, 6 Stuhlproben, von denen 3 positiv waren, und 6 Blutproben. Bemerkenswert ist der Ausfall der Agglutinationen bei diesen Kranken.

	Agglutination des Krankenserums mit				
	Paratyphus B Schottmüller Bazillen	Breslau-Bazillen Epidemiestamm	2 Mon. später Paratyphus B Schottmüller-Bazillen	Breslau-Bazillen Epidemiestamm	Breslau-Bazillen, fremder Stamm
Fall A	—	1:100 +	1:25 +	1:25 +, 1:50 ±	1:25 +
„ B	1:25 +, 1:50 ±	1:100+, 1:200±	1:25 +	1:50 +	1:25 +
„ C	—	1:50+, 1:100 ±	—	—	—
„ D	1:50 +	1:100 +	nicht angesetzt	.	.
„ E	1:50 +	1:100 +	dgl.	.	.
„ F	—	1:100+, 1:200±	—	.	.

Die 2. kleinere Epidemie wurde etwa 10 Tage später beobachtet; wieder handelte es sich um Schlachtprodukte des gleichen Roßschlächters, die aber von einem 2. Pferde stammten, aus dem Fleisch wurden Breslau-Bazillen gezüchtet, ebenso aus 4 Stuhlproben von Erkrankten.

Die in dieser Epidemie isolierten Stämme zeigten nun aber ein gänzlich anderes agglutinatorisches Verhalten. Sie wurden von dem Breslau-Immunserum nur 1:1000 bzw. 2000 agglutiniert, dagegen von dem Paratyphus B-Immunserum bis 1:16000 (Titer: 10000).

Der Verdacht, daß es sich bei der 2. Epidemie um Verschmutzung von gesundem Pferdefleisch durch Reste der früheren Schlachtung handeln könnte, wurde dadurch hinfällig. Weiter wurde der Verdacht noch entkräftet durch das agglutinatorische Verhalten der Patienten-Seren aus dieser Epidemie, das auch in der Beziehung lehrreich ist, daß nicht jeder Breslau-Stamm zur Differentialdiagnose geeignet ist, sondern daß dazu möglichst ein in der gleichen Epidemie gewonnener Stamm verwendet werden soll.

	Agglutination mit Paratyphus B Schottmüller	Breslau-Stamm der 1. Epidemie	Breslau-Stamm der eigenen Epidemie
Fall A	—	1:25 +	1:25 +
„ B	1:25 +	1:25 +	1:50 +
„ C	—	1:25 +	1:25 +
„ D	1:25 +	1:25 +	1:50 +
„ E	1:25 +	1:25 +	1:50 +
„ F	—	1:25 +	1:25 +

Noch deutlicher geht dies aus folgendem Protokoll hervor:

Serum einer an Gastroenteritis Erkrankten agglutiniert

eigenen Stamm (Breslau-Stamm)	1:200	nach 24 Std.	1:400
fremden Breslau-Stamm 550	1:200	„ 24 „	1:200
„ „ „ B	—		—
echten Paratyphus B-Stamm 379	1:100 +	„ 24 „	1:200
„ „ „ 388	1:200	„ 24 „	1:200

Hier wird ein echter Breslau-Stamm überhaupt nicht agglutiniert, während ein zweiter sich ebenso verhält wie die echten Paratyphus B-Stämme.

Wallbildung soll bei Breslau-Stämmen nicht auftreten. Bitter (l. c.), der sich besonders mit dieser Frage beschäftigt hat, hat aber schon eine kleine Einschänkung gemacht, indem er bei einem echten Breslau-Stamm am 3. Tage doch einmal radiäre Schleimwälle auftreten sah. An den von mir isolierten Stämmen zeigte die überwiegende Mehrzahl keinerlei Wallbildung, bei einem Stamm trat ebenfalls am 3. Tage geringe Wallbildung auf, bei 3 Stämmen dagegen traten anfänglich deutliche Wälle auf, trotzdem diese Stämme sich im Tierversuch sowie auch nach den klinischen Erscheinungen als echte Fleischvergifter erwiesen.

Es gilt also auch von den Fleischvergiftern, daß man sich nur auf die Wallbildung allein nicht völlig verlassen kann, wenn gleich sie in der Mehrzahl der Fälle ein gutes Unterscheidungsmittel ist.

Bei den Tierversuchen sind mit einer Ausnahme sämtliche mit Reinkultur auf Brot gefütterten Tiere gestorben, meist im Verlauf einer Woche. Die kürzeste Zeit betrug 3 Tage, die längste 14 Tage. Desgleichen sind die mit natürlich infizierten Fleisch- oder Wurstproben gefütterten Mäuse gestorben, in 2 Fällen allerdings erst nach 15, bzw. 17 Tagen. Der einzige Versager war folgender: Von 2 mit dem gleichen Breslau-Stamm gefütterten Mäusen starb nur die 1., während die andere gesund blieb. Daß auch sie reichlich Bazillen aufgenommen hatte, ging aus der anfänglich bei ihr beobachteten Ausscheidung hervor. Bernewitz (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 102. 1924. Heft 1/4), der mit Breslau-Stämmen in verschiedenen Mengen eine große Anzahl Mäuse gefüttert hat, sagt: „Immerhin ist wohl anzunehmen, daß bei einer sehr großen Zahl von Versuchstieren, auch bei sehr vielen verfütterten Bakterien eine oder das andere am Leben geblieben wäre." Die obige Beobachtung ist aber kein Grund, um dem Tierfütterungsversuch gegenüber besonders mißtrauisch zu sein.

Bitter mahnt zur vorsichtigen und kritischen Beurteilung der Fütterungsversuche; darin kann man ihm nur beistimmen. Weniger überzeugend ist seine Schlußfolgerung, daß Breslau-Bakterien, die sich ja häufig im Mäusedarm saprophytisch fänden, durch eine andere Krankheit die Invasion ermöglicht wurde, d. h. also, daß dann die Mäuse gar nicht an dem verfütterten, sondern an einem eigenen, darmbewohnenden Stamme gestorben seien. Wenn dies häufiger der Fall wäre, dürften an weißen Mäusen die differentialdiagnostischen Fütterungsversuche gar nicht angestellt werden. Keines der von mir zur Fütterung benutzten Tiere ist zum Versuch herangezogen, ohne daß nicht zum mindesten eine 1malige, meist 3malige Stuhluntersuchung unter Zuhilfenahme der Malachitgrünplatte die Abwesenheit von Bazillen der Paratyphusgruppe dargetan hatte. Es sind niemals solche in meiner Tierzucht gefunden.

Die Ausscheidungen der gefütterten Tiere sind regelmäßig untersucht. Bernewitz hat nur bei einem Teile seiner Mäuse die Bak-

terien im Stuhl nachgewiesen. Bei meinen Versuchen waren sie regelmäßig zu finden, was wohl an der sehr großen Zahl der von mir verfütterten Bakterien lag. Es trat zuerst eine Abnahme, dann wieder eine Zunahme der Bakterien in den Stühlen auf, wie sie schon von Müller (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 62), Bitter (ibid. Abt. I. Orig. Bd. 88) u. a. festgestellt ist. Nach dem Tode der Tiere konnten stets aus Herzblut, Milz, Darm (zuweilen wurden auch andere Organe, wie Leber, Niere, mit Erfolg herangezogen) die Bazillen gezüchtet werden. Nie wurde Wallbildung beobachtet, trotzdem diese anfänglich bei 3 verfütterten Stämmen bestanden hatte, wie dies auch Bitter in einem Fall gesehen hat.

Um zu sehen, ob nicht allein durch Breslau-Bazillen, sondern auch durch die durch sie gebildete Toxine weiße Mäuse durch Verfütterung getötet werden können, wurden keimfreie Stuhlfiltrate von akut erkrankten Menschen und 1 aus natürlich infizierten rohem Pferdefleisch hergestelltes Filtrat verfüttert. Die mit den Stuhlfiltraten gefütterten Mäuse blieben gesund, das mit dem Fleischfiltrat gefütterte Tier starb am 14. Tage. Sein Stuhl war während des Lebens frei von Bazillen, ebenso fehlten diese bei der Sektion im Herzblut, Milz und Darm. Leider konnten die Versuche nicht fortgesetzt werden.

Weiter wurde mit 3 verschiedenen Breslau-Stämmen eine graue Ratte 4mal an verschiedenen Tagen gefüttert. Nach jeder Fütterung konnten für kurze Zeit (1—3 Tage) die Bazillen im Stuhl nachgewiesen werden, dann hörte jedesmal die Ausscheidung auf. 4 Tage nach der letzten Fütterung wurde die Ratte getötet; Herzblut und Milz waren steril, im Darm keine Breslau-Bazillen nachzuweisen, das Blutserum agglutinierte weder Breslau- noch Paratyphus B-Bazillen in irgendeiner Konzentration.

Eine 3. Art der Unterscheidung zwischen echten Paratyphus B-Bazillen und Breslau-Bazillen soll durch das einfache agglutinatorische Verhalten dieser Bazillen in dem jeweiligen spezifischen Immunserum möglich sein. Zuweilen trifft dies in hohem Maße zu, wie schon bei der 1. Fleischvergiftung in Jena an einem Stamme ausgeführt ist, aber durchaus nicht immer. Bei der kurz darauf beobachteten Epidemie wurde das infizierende Bakterium gerade umgekehrt durch ein Parat. B-Immunserum viel besser agglutiniert als durch ein Breslau-Immunserum. Ein anderes von mir hergestelltes Breslau-Immunserum beeinflußte die Breslau-Stämme besser als die echten Parat. B-Stämme, ließ aber 2 (aus der gleichen Epidemie stammende) echte Breslau-Stämme, wie in wiederholten Versuchen festgestellt wurde, völlig in der Agglutination aus, während diese 2 Stämme durch 2 andere Breslau-Immunseren bis zum Endtiter, und durch verschiedene Parat. B-Immunseren sehr hoch agglutiniert wurden. Andererseits wurden einige Breslau-Stämme durch ein vom Institut „Robert Koch" geliefertes Paratyphus B-Immunserum (1:10000) nur bis 1:1000 oder überhaupt nicht in einer nennenswerten Verdünnung agglutiniert. Wir haben ja auch gesehen, daß sich Patientenseren verschieden gegenüber 2 verschiedenen Breslau-Stämmen verhalten können.

Es ist also nötig, daß der einfache Agglutinationsversuch nicht nur mit einem spezifischen Breslau-Immunserum überhaupt, sondern mit mehreren solcher Seren oder einem polyvalenten angestellt wird, sonst dürften Fehldiagnosen möglich sein. Wahrscheinlich erklärt sich auch so der Bitter (l. c.) verwunderlich erscheinende Umstand, daß

Einfacher Agglutinationsversuch mit Krankenserum von Frau E. H., entnommen in der Rekonvaleszenz nach echter Paratyphus B-Erkrankung.

Paratyphus B-Stämme	2 Std. Brutschrank, 1 Std. Zimmertemperatur					20 Std. Zimmertemperatur				
	200	400	800	1600	Kontrolle	200	400	800	1600	Kontrolle
Eigener Stamm	+++	++	+	±	—	+++	++	+	+	—
Ganz frischer B.-Stamm 1567	+++	++	+	±	—	+++	++	+	+	—
Alter B.-Stamm Schönherr (Bazillenträger)	++	+	+	—	—	++	+	+	—	—
Alter B.-Stamm Boland (Bazillenträger)	+++	++	+	±	—	+++	++	+	±	—
Alter B.-Stamm Wanner (Bazillenträger)	++	++	+	±	—	++	++	+	±	—
Breslau-Stämme:										
Frischer Stamm Polz	+	+	±	—	—	+	+	±	—	—
„ „ Kaps	+	+	+	±	—	+	+	+	±	—
Alter Stamm Breslau	+++	++	+	—	—	+++	++	+	—	—
„ „ Ronneburg	+	—	—	—	—	+	—	—	—	—
„ „ Böttcher	+	—	—	—	—	+	—	—	—	—
„ „ Riemann	++	+	+	+	—	++	+	+	±	—

Dasselbe Serum in Verdünnung 1:100 abgesättigt mit abgetöteten (1 Std.
I mit eigenem Stamm } echte Paratyphus
II „ Stamm Schönherr } B-Bazillen
III „ „ Polz Breslau-Bazillen

	Serum I								Serum II								Serum III							
	2h Brutschrank				Zimmert. bis 24h				2h Brutschrank				Zimmert. bis 24h				2h Brutschrank				Zimmert. bis 24h			
	200	400	800	1600	200	400	800	1600	200	400	800	1600	200	400	800	1600	200	400	800	1600	200	400	800	1600
Eigener Stamm	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	±	—	—	—	+++	++	+	—	+++	++	+	—
Stamm 1567	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	±	—	—	—	++	+	—	—	++	+	±	—
„ Schönherr	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+++	++	±	—	+++	++	±	—
„ Boland	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	±	—	+	+	±	—	++	+	—	—	++	+	—	—
„ Wanner	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	—	—	+	+	±	—	++	+	±	—	++	+	±	—
„ Polz	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
„ Kaps	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—
„ Breslau	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	±	—	+	+	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—
„ Ronneburg	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
„ Böttcher	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
„ Biermann	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	±	—	+	+	±	—	++	+	—	—	++	+	—	—
„ Typhus	—	—	—		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

ebensowenig wie Manteufel und Beger auch Schiff, der ein von Bitter überlassenes hochwertiges Serum in Händen hatte, die einfachen agglutinatorischen Unterschiede zwischen Paratyphus B- und Enteritisbakterien finden konnte.

Die echten Paratyphus B-Stämme werden dagegen durch die verschiedensten erprobten Paratyphus B-Immunserum immer in der genügend hohen Verdünnung agglutiniert, meist schon in einer $^1/_2$ Std. Zimmertemp., wie Lentz zuerst festgestellt hat.

Durch die Rezeptorenanalyse nach Weil u. Felix konnte Schiff (Ztschr. f. Immunf. Bd. 33. S. 511) zwischen den echten Paratyphus

B-Bazillen und den Fleischvergiftern der Paratyphus-Gruppe regelmäßig serologische Unterschiede finden. „Die Auswahl der zur Bindung verwandten Stämme ist auf das Ergebnis nicht ganz ohne Einfluß, da manche Stämme überhaupt schwächer binden als andere. Stets kam also dabei zum Ausdruck, daß die Agglutinine für Fleischvergifter sich leichter aus dem Serum entfernen lassen."

Olitzki (l. c.) fand bei Absättigungsversuchen einen Teil seiner Stämme scharf in echte Paratyphus B- und Breslau-Stämme geschieden, die sowohl Verwandtschaft mit Paratyphus B- wie mit Breslau-Bazillen hatten.

Bei meinen eigenen Absättigungsversuchen, auf deren tabellarische Wiedergabe verzichtet wird, zeigten sich echte Paratyphus B-Stämme im allgemeinen gegeneinander ebenso wie gegen Fleischvergifter im Sinne der deutlichen Uebereinstimmung oder der deutlichen Trennung wohl charakterisiert. Anders verhielt es sich aber mit den von mir gezüchteten Breslau-Stämmen. Hier versagten einige Breslau-Stämme gegen andere Breslau-Stämme vollständig und umgekehrt, während diese Stämme bei anderen Breslau-Stämmen sehr wohl alle Agglutinine für Fleischvergifter entfernten.

Als Beispiel, daß auch ein Krankenserum im einfachen Agglutinationsversuch und in Absättigungsversuchen gegen homologe (in

60°) **Bazillen.**

IV mit Stamm Breslau } **Breslau-Bazillen**
V „ „ Kaps }
VI „ Stamm Biermann (Breslau-Bazillen.)
VII mit „ 1567 (echte Paraty B-Baz.)

Serum IV								Serum V								Serum VI								Serum VII							
2h Brutschrank				Zimmert. bis 24h				2h Brutschrank				Zimmert. bis 24h				2h Brutschrank				Zimmert. bis 24h				2h Brutschrank				Zimmert. bis 24h			
200	400	800	1600	200	400	800	1600	200	400	800	1600	200	400	800	1600	200	400	800	1600	200	400	800	1600	200	400	800	1600	200	400	800	1600
++	+	±	—	++	+	±	—	++	+	±	—	++	+	±	—	+	+	±	—	+	+	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—
++	+	±	—	++	+	±	—	++	+	—	—	++	+	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	±	—	+	+	+	—
++	+	—	—	++	+	—	—	++	+	—	—	++	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
++	+	—	—	++	+	—	—	++	+	—	—	++	+	—	—	+	+	±	—	+	+	±	—	+	+	+	—	+	+	+	—
++	+	±	—	++	+	+	—	++	+	—	—	++	+	—	—	+	±	—	—	+	±	—	—	+	±	—	—	+	±	—	—
—	—	—	—	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	±	—	—	+	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	++	+	—	—	++	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	nicht angesetzt				.	.	.	.
+	+	—	—	++	+	—	—	++	+	—	—	++	+	—	—	+	+	±	—	+	+	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

diesem Falle echte Paratyphus B-)Stämme versagen kann und umgekehrt, sei vorstehendes Protokoll (S. 92 und 93) aufgeführt.

Ein 2. Protokoll eines **einfachen Agglutinationsversuches, der zweimal im Verlauf einer echten Paratyphus B-Erkrankung angestellt werden konnte, ist folgendes:**
R. H. erkrankt 6. V. Agglutination am 15. V.

	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1000
Eigener Stamm	+	+	+	+	+	—
Echter B.-Stamm	+	+	+	+	+	—
Breslau- „	—	—	—	—	—	—
Typhus- „	+	+	—	—	—	—

Agglutination 1 Woche später:

	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/4000	1/5000
Eigener Stamm mit Wallbildung	+	+	+	+	+	+	+	+	—
„ „ ohne „	+	+	+	+	+	+	+	+	—
Echter B.-Stamm	+	+	+	+	+	+	+	+	—
Breslau-Stamm	+	+	—	—	—	—	—	—	—
Typhus- „	+	+	±	—	—	—	—	—	—

Aus diesen Versuchen läßt sich der Schluß ziehen, daß wir im allgemeinen in den echten Paratyphus B-Stämmen wohlcharakterisierte, ziemlich konstante Bakterien vor uns haben, während zu den Fleischvergiftern eine ganze Gruppe Paratyphus B-ähnlicher Bakterien gehört. Damit stimmt überein, wenn Trawiński (l. c.) viele solcher nicht wallbildender Stämme im gesunden Tierkörper und in der Außenwelt gefunden hat. „Sie täuschen sicher oft den echten Paratyphus B (Schottmüller) vor, dessen Verbreitung in der Außenwelt gar nicht so stark zu sein scheint, wie manche annehmen" (Trawiński, l. c.) Bei der großen Verwandtschaft der einzelnen Vertreter der Paratyphus B-Gruppe können sich Unterschiede, die sonst stark ausgeprägt vorhanden sind, wohl einmal etwas verwischen. Wir müssen uns doch vorstellen, daß sowohl Typhus- wie Paratyphus-Bazillen und die verschiedenen Enteritis-Erreger aus der Coli-Gruppe als Stammform hervorgegangen sind. Der Typhusbazillus hat eine völlige Anpassung an den Menschen vollzogen und damit eine Ruheform gefunden, die ihn deutlich von seinen Verwandten unterscheiden läßt. Der Paratyphus A-Bazillus hat das gleiche getan, nur keine so große Verbreitung wie der der Typhusbazillus gefunden, den wir bei Bewohnern der ganzen Erde antreffen. Aus der Gruppe der Paratyphus B-Bazillen ist jetzt einer, nämlich der Paratyphus B-Bazillus Schottmüller, scheinbar auch auf dem Wege, sich dem Menschen besonders anzupassen, indem er in diesem, wie der Typhusbazillus, ein trotz seiner Vielgestaltigkeit wohlcharakterisiertes Krankheitsbild hervorruft und sich ebenso wie dieser in den Dauerausscheidern häuslich niederläßt. Auf dieser Wegstrecke seiner Entwicklung treffen wir ihn an.

Ueber wachstumfördernde Eigenschaften der Filtrate von Tuberkelbazillenkulturen und anderer Stoffe.

[Aus dem Institut für experimentelle Therapie „Emil von Behring" Marburg a. d. L. (Direktor: Prof. Dold).]

Von Privatdozent Dr. **Hans Schmidt.**

Nach Untersuchungen von R. Bieling[1]) über die intramolekulare Atmung der Bakterien besitzen im allgemeinen alte Bouillonkulturen die Eigenschaft, die intramolekulare Atmung von Bakterien zu fördern,

1) Bieling, R., Ztschr. f. Hyg. Bd. 100. 1923. S. 270.

während bei bestimmten Bakterienarten in der Bouillon auch hemmende Eigenschaften nachweisbar sind. Letztere sind insofern spezifisch, als sie nur gegenüber den Bakterien in Erscheinung treten, die ihre Bildung in der Bouillon veranlaßt haben, während andere Bakterien in ihrer Atmung nicht nur nicht gehemmt, sondern sogar gefördert werden. Schon normale Bouillon enthält nach Bieling Stoffe, welche die Atmung von Bakterien steigern, und diese werden im Laufe der Bakterienentwicklung in der Bouillon vermehrt. Diese Förderwirkung ist unspezifisch, insofern nicht nur die Atmung derjenigen Bakterien gefördert wird, die zur Bildung dieser Bouilloneigenschaft beigetragen haben, sondern auch die Atmung aller anderen Bakterien. Das Bouillonfiltrat behält diese Eigenschaft auch nach Einwirkung von Siedehitze.

Es ist nun anzunehmen, daß in der Regel eine Steigerung der intramolekularen Atmung auch mit einer beschleunigten Vermehrung der Bakterien einhergeht, wenn das auch nicht stets der Fall zu sein braucht. Dabei darf man jedoch nicht ohne weiteres die atmungsfördernden Stoffe den das Wachstum beschleunigenden gleichsetzen, denn nach Untersuchungen von Schmidt und Greifenstein[1]), an Filtraten alter Staphylokokkenbouillonkulturen werden zwar Stoffe gebildet, die das Wachstum fördern. Es scheinen jedoch Unterschiede gegenüber den auf die Atmung wirkenden Stoffen zu bestehen, insofern unter anderem die das Wachstum fördernde Wirkung im Filtrat nach Einwirkung von Siedehitze verschwindet.

Aus folgenden Versuchen geht hervor, daß auch das Filtrat alter Tuberkelbazillenkulturen, die auf synthetischem, albumosefreiem Nährboden gewachsen waren, die Eigenschaft besitzt, das Wachstum neu angesetzter Tuberkelbazillenkulturen auf dem gleichen Nährboden zu beschleunigen.

Der benutzte albumosefreie Nährboden hatte folgende Zusammensetzung: Mononatriumphosphat 15 g, Monokaliumphosphat 20 g, Magnesiumsulphat 3 g, Magnesiumnitrat 12,5 g, Asparagin 25 g, Glyzerin 15 g, Ammoniumkarbonat 17,5 g, Aqua dest. 5000 ccm.

Versuch I.

Eine 6 Mon. alte Tuberkelbazillenkultur (Stamm 43) wurde durch eine Tonkerze filtriert und das Filtrat 1 Std. im Autoklaven bei 110° erhitzt. Zu 100 ccm albumosefreien Nährbodens wurden fallende Mengen dieses Filtrats zugesetzt, und dann wurden die Kolben mit möglichst gleicher Menge einer frischen Kultur des gleichen Stammes beimpft. Nach 40 Tagen Aufenthalt bei 35—37° C wurden sämtliche Kulturen durch gehärtetes Filtrierpapier (Schleicher u. Schüll Nr. 575) filtriert und die Filter nach gründlicher Trocknung gewogen. Da das Gewicht dieser Filter gleich der Summe der Gewichte der Filtersubstanz, der Tuberkelbazillen und der getrockneten Salze des Nährbodens war, mußte von den so erhaltenen Gewichten das Filtersubstanzgewicht = 0,549 g abgezogen werden, um die Gewichte der gewachsenen Tuberkelbazillenmassen zu erhalten. Diese Zahl entsprach dem Durchschnittsgewicht mehrerer Filter, die nach Durchtränkung des Filters mit der reinen Nährbodenflüssigkeit getrocknet worden waren. Die Gewichte der getrockneten Salze konnten als stets gleicher Faktor in der Rechnung vernachlässigt werden.

1) Schmidt, H., u. Greifenstein, A., M. M. Woch. 1924. Nr. 23.

Das Ergebnis des Versuches gibt folgende Tabelle:

Tuberkelbazillenkulturfiltrat 1 Std. auf 110° C erhitzt. Filtratzusatz	Gewicht des Filtrats plus Filter in g	Dieses Gewicht — 0,549 (Filtratgewicht) in mg	Differenz gegenüber dem normalen Wachstum der Kontrolle
Unverdünnt 5 ccm	0,622	73	— 27
„ 1 „	0.6145	75	— 25
1 : 10 verdünnt 1 ccm	0 677	128	+ 28
1 : 100 „ 1 „	0,949	300	+ 200
1 : 1000 „ 1 „	0,806	257	+ 157
1 : 10 000 „ 1 „	0,660	111	+ 11
Kontrolle ohne Filtratzusatz (Mittelwert aus 8 Versuchen)	0,6491	100	.
Kontrolle mit Filtrat allein	0,568	19	— 81

Aus diesem Versuch läßt sich eine Vermehrung des Durchschnittsertrages bis zum Doppelten entnehmen. Die das Wachstum fördernde Eigenschaft des Filtrates kommt erst von gewissen Verdünnungen an zur Wirkung. Das reine Filtrat entfaltet, wie die Kontrolle sowie der Ausfall der Kulturen, in denen es in größerer Menge zugesetzt war, zeigen, hemmende Eigenschaften, was ja einer den Bakteriologen bekannten Beobachtung entspricht, daß frische Aussaat auf gebrauchtem Nährboden schlecht oder gar nicht mehr angeht, ohne daß eine bloße Erschöpfung an Nährmaterial vorzuliegen braucht. Das Optimum, das bei obigem Versuch einem Filtratzusatz von 0,01 ccm entsprach, ist unsicher, da es in anderen Versuchen nicht an gleicher Stelle, oft auch überhaupt nicht zum Ausdruck kam. Immerhin muß aus theoretischen Erwägungen irgendwo ein Optimum anzunehmen sein.

Die Verhältnisse scheinen jedoch nicht so einfach zu liegen, daß man nur von einem fördernden Stoff in dem Filtrat sprechen kann, der in diesem Falle hitzebeständig ist. Denn wie der folgende Versuch II zeigt, kann das unerhitzte Filtrat gelegentlich eine größere Wachstumsförderung bewirken als das erhitzte.

Versuch II.

Eine 3 Monate alte Kultur von Tuberkelbazillen (Stamm 43) wurde durch einen Seitz-(Asbest-)filter keimfrei filtriert und ein Teil des Filtrates 1 Std. lang auf 100 ° erhitzt. Nach Zusatz fallender Mengen unerhitzten und erhitzten Filtrates wurden alle, 100 ccm albumosefreien Nährböden enthaltenden Kolben mit möglichst gleichen Mengen des gleichen Tuberkelbazillenstammes beimpft und nach 29 Tagen Brutschrankaufenthalt genau wie bei Versuch I behandelt. Das Resultat gibt nachstehende Tabelle (S. 97).

Aus dem Versuch II geht hervor, daß die größte Ausbeute an Tuberkelbazillen mit unerhitztem Filtrat zu verzeichnen war, und zwar bei dem Zusatz von 1 ccm des unverdünnten Filtrates, während der gleiche Zusatz erhitzten Filtrats, wie beim Versuch I, einen Ertrag unter dem Durchschnitt bewirkte. Man hat den Eindruck, daß in dem unerhitzten Filtrat neben der allgemein fördernd wirkenden Substanz, die auch bei Versuch I ersichtlich ist, ein unabhängiger zweiter fördernder Faktor vorhanden ist, der aber thermolabil ist. Dies würde mit

	Unerhitztes Filtrat			Erhitztes Filtrat		
	Gewicht von Filtrat + Filter in g	Dieses Gewicht — 0,549 (Filtergewicht) in mg	Differenz gegenüber normalem Wachstum	Gewicht von Filtrat + Filter in g	Dieses Gewicht — 0,549 (Filtergewicht) in mg	Differenz gegenüber normalem Wachstum
Filtratzusatz:						
Unverdünnt 5 ccm	0,798	249	+ 55	0,710	161	— 33
" 1 "	0,844	295	+ 101	0,719	170	— 24
1 : 10 verdünnt 1 "	0,705	156	— 38	0,697	118	— 46
1 : 100 " 1 "	0.685 [1]	(136)	(— 58)	0,664	115	— 79
1 : 1000 " 1 "	0,830	281	+ 87	0,766	217	+ 23
1 : 10 000 " 1 "	0,731	182	— 12	0,745	196	+ 2
1 : 100 000 " 1 "	0,560 [1]	(11)	(— 183)	0,815	266	+ 72
Kontrolle ohne Zusatz (Mittelwert)	0,743	194	.	.	.	.

den oben erwähnten Beobachtungen von Schmidt und Greifenstein an Staphylokokkenkulturen im Einklang stehen, bei denen das Bouillonfiltrat eine hitzeunbeständige fördernde und eine hitzebeständige hemmende Eigenschaft zeigte.

Eine allgemein fördernde Wirkung des erhitzten Filtrates geht aus diesem Versuch nicht hervor, denn einem Plusertrag von 72 steht ein Minus von 79 gegenüber. Allerdings war die für das Filtrat verwendete Kultur nur 3 Monate alt, während die bei Versuch I verwendete Kultur 6 Monate alt war.

Nun haben Borrel, Boez und de Coulon (Compt. rend. Soc. Biol. T. 89. 1923. p. 191) Versuche veröffentlicht, nach denen ein geringer Zusatz eines 3 Std. auf 70^0 erhitzten Filtrates einer 2 Mon. alten Kultur auf albumosefreiem Nährboden zu einer frischen albumosefreien Tuberkelbazillenkultur nach 40 Tagen eine Mehrausbeute von 74 Proz. gab. Auch sie hatten bei Verwendung größerer Mengen des erhitzten Filtrates eine geringere Ausbeute gehabt, analog dem Versuch I, bei dem jedoch das Filtrat auf 110^0 erhitzt worden war. Vielleicht war aber ein 1stünd. Erhitzen auf diese Temperatur zu lang. Zu hoch war die Temperatur nicht, da diese Autoren angaben, daß die fördernde Substanz des Filtrates selbst ein Erhitzen auf 120^0 15 Min. lang vertragen kann. Auch der Zusatz eines nicht vorher erhitzten Filtrates ergab bei den genannten Autoren eine Mehrausbeute von etwa 50 Proz., gegenüber 100 Proz. Mehrausbeute bei erhitztem Filtratzusatz, was ich aber im Versuch II nicht bestätigen konnte. Dies kann zum Teil darin begründet sein, daß der von mir benutzte Tuberkelbazillenstamm Nr. 43 schnell und üppig wuchs während die oben genannten Autoren betonten, einen langsam wachsenden Stamm benützt zu haben, weswegen ihre absolute Ausbeute auch sehr viel geringer war.

Solche das Wachstum von Tuberkelbazillen fördernde Eigenschaften haben nach diesen Autoren nicht nur Filtrate von humanen Tuberkelbazillenkulturen, sondern auch solche von Rindern und Vogeltuberkelbazillen sowie von Mucor-Hefen. Diese Eigenschaft ist demnach als unspezifisch zu betrachten, wenngleich umgekehrt angelegte Versuche für das Wachstum von Hefen noch nicht gemacht sind.

1) Diese Zahlen sind als nicht ganz sicher zu betrachten wegen geringer sekundärer Verunreinigungen der TB-Kulturen.

Besonderes Interesse aber hatte die Angabe dieser Autoren, daß auch Blut gleiche wachstumfördernde Eigenschaften besitzt, und zwar trat bei Zusatz geringer Menge die Mehrausbeute an Tuberkelbazillen besser zutage, wenn das Blut vorher auf 100° C erhitzt wurde, wohingegen bei Zusatz größerer Mengen (ca. 1 ccm) unerhitztes Blut besser wirkte. So steigerte der Zusatz von 1 ccm unerhitzten Meerschweinchenblutes die Tuberkelbazillenernte nach 30 Tagen um das 5fache.

Ein ähnlich angesetzter Versuch ist der folgende.

Versuch III.

Der Zusatz des Blutes hatte einen flockigen Bodensatz zur Folge. Abfiltrier wurden darum nur die auf der Oberfläche schwimmenden Tuberkelbazillen, während der Bodensatz, der unter anderem auch zu Boden gesunkene Tuberkelbazillen enthält, für sich filtriert und gewogen wurde.

Zu je 100 ccm albumosefreien Nährbodens war zugesetzt		Gewicht der Tb-Bazillen + Filter	Das gleiche Gewicht — 0,549 (Filtergewicht) in mg	Differenz gegenüb. normal. Wachstum	Gewicht des Bodensatzes + Filter	Dasselbe Gewicht — 0,549 (Filtergewicht) in mg
Durch Herzpunktion gewonnenes frisches Meerschweinchenblut	0,1 ccm	0,6850 g	136	+ 36	0,6230	74
	0,5 „	0,7010 „	152	+ 52	0,6200	71
	1,0 „	0,6838 „	134	+ 34	0,6080	69
Dasselbe erhitzt auf 100°	0,1 „	0,8720 „	323	+ 223	0,5950	46
	0,5 „	0,7650 „	216	+ 116[1]	0,7100	161
	1,0 „	0,8195 „	270	+ 170[1]	0,7520	203
Plasma (1proz. Na. citr.)	1,0 „	0,7575 „	208	+ 108	.	.
Dasselbe erhitzt auf 100°	1,0 „	0,7225 „	173	+ 73	.	.
Kontrolle ohne Zusatz, Mittelwert		0,6491 „	100	.	.	.

Der Versuch zeigt in der Tat, daß Blutzusatz eine Steigerung des Wachstums der Tuberkelbazillen bewirkt und bestätigt die Beobachtung obengenannter Autoren, daß der Zusatz geringerer Mengen erhitzten Blutes das Wachstum mehr fördert als größere Mengen, wohingegen das Umgekehrte beim frischen Blut weniger deutlich zutage trat. Beim Plasmazusatz fand zwar auch eine Wachstumssteigerung statt, jedoch scheint, soweit ein einmaliger Versuch diesen Schluß erlaubt, unerhitztes besser zu wirken als erhitztes. Es dürfte interessant sein, den Bestandteil des Blutes ausfindig zu machen, dem diese fördernde Wirkung zuzuschreiben ist.

Eine im prozentualen Verhältnis entsprechende Vermehrung der Tuberkelbazillenernte wurde auch bei Zusatz von Eisenchlorid zu Glyzerinbouillonnährboden beobachtet, während Manganchlorid diese Förderungswirkung vermissen ließ.

1) In diesen beiden Kolben war der Bodensatz besonders stark und enthielt daher im Verhältnis auch mehr Tuberkelbazillen. Die beiden Zahlenwerte 116 u. 170 sind demnach sicher zu niedrig.

Im folgenden ist das Protokoll eines Versuches mit Eisenchloridzusatz zu Glyzerinbouillonkulturen von Tb-Bazillen (Stamm 43) wiedergegeben, 53 Tage langes Wachstum bei 35—70°.

Zusatz von Eisenchlorid in Gramm fester Substanz zu 100 ccm Glyzerinbouillon	Gewicht der getrockneten Bakterien + Papierfilter in Gramm	Gewicht der getrockneten Bakterien in mg	Differenz gegenüber normalem Wachstum
0,1	1,175	580	+ 54
0,05	1,295	702	+ 196
0,01	1,436	841	+ 335
0,005	1,23	635	+ 129
0,001	1,325	730	+ 224
Kontrolle, Mittelwert aus 6 Beobachtungen	1,101	506	.

Ob sich damit auch eine vermehrte Tuberkulinausbeute erzielen läßt, ist noch nicht sichergestellt. Leider stört aber der Zusatz von Eisensalzen die Karbolisierung, da er Anlaß zu einer Farbenreaktion gibt.

Zusammenfassung.

Es konnte gezeigt werden, daß die Filtrate alter Glyzerinbouillonkulturen von Tuberkelbazillen die Eigenschaft haben, das Wachstum neuer Kulturen anzuregen und die Ausbeute an Tuberkelbazillen zu steigern. Diese Eigenschaft des Filtrates wird durch 1stünd. Erhitzen auf 100° C nur in geringem Maße vermindert.

Auch Zusatz von frischem Blut in geringen Mengen zu der Nährbouillon hat eine Steigerung des Wachstums zur Folge. Dies tritt bei auf 100° C erhitztem Blut noch stärker in die Erscheinung.

Hohe Ausbeute von Tuberkelbazillen wurde auch durch Zusatz geringer Mengen Eisenchlorid (0,1—0,001 g-Proz.) erzielt.

Nachtrag bei der Korrektur:

A. Frouin und M. Guillaumie (Compt. rend. Soc. Biol. T. 90. 1924. p. 831) haben bei Glyzerinbouillon Kulturen von Tuberkelbazillen mit einem Zusatz von 1:100 000 Eisen in Form von Eisenammoniumzitrat eine Steigerung der Bazillenausbeute um das doppelte bis dreifache gesehen.

Ueber Konstanz und Variabilität bei dem Pfeifferschen Influenzabazillus in Beziehung zur Influenzafrage.

[Aus dem Statens Seruminstitut Kopenhagen (Direktor: Dr. Th. Madsen).]

Von **Martin Kristensen**, Abteilungsvorsteher.

I. Allgemeines.

Daß der Pfeiffersche Bazillus nicht ganz mit Unrecht den Namen Influenzabazillus bekommen hat, wird wohl heute von allen

zugegeben, da er nicht nur außerordentlich häufig bei Influenza vorkommt, sondern ihm auch in vielen Fällen eine wesentliche Bedeutung für die Schwere und den Verlauf der Krankheit zukommt. Hier wollen wir uns jedoch weder mit der Bedeutung des Pfeifferschen Bazillus für Influenza im allgemeinen noch mit der Influenzaätiologie im allgemeinen beschäftigen, sondern ausschließlich mit der speziellen Frage, ob der Pfeiffersche Bazillus als das primäre Influenzavirus anzusehen ist oder nicht. (Wir gehen also von der Annahme aus, daß es überhaupt ein bestimmtes primäres Influenzavirus geben muß.) Und auch diese Frage werden wir von einem speziellen Gesichtspunkte aus behandeln.

In der Diskussion darüber, ob der Pfeiffersche Bazillus als das primäre Influenzavirus anzusehen ist, hat man sich (in Deutschland und anderen europäischen Ländern) vorwiegend mit den folgenden Verhältnissen beschäftigt: mit der Verbreitung des Bazillus bei Influenzakranken, bei Personen mit andern Krankheiten und bei Gesunden, mit dem Zusammenhang seines Auftretens mit dem Verlauf der Epidemien und Pandemien, mit dem zeitlichen Auftreten des Bazillus im Verlaufe der Krankheit und mit seiner Lokalisation in den erkrankten Atmungsorganen, ferner mit der Bildung von spezifischen Antikörpern im Organismus und endlich mit seinen durch das Experiment feststellbaren Eigenschaften, die Erkrankungen bei Tieren und Menschen hervorrufen.

Wie ich — übrigens im Anschluß an zahlreiche Arbeiten anderer Autoren — in meiner Monographie über das Vorkommen und die Klassifizierung des hämoglobinophilen Bakterien (S. 58—63) versucht habe zu zeigen, sind alle die in den erwähnten Beziehungen erhobenen Befunde ungenügend, um die Rolle des Pfeifferschen Bazillus als primäres Influenzavirus zu beweisen. Man hat behauptet, daß die Versuche von Blake u. Cecil, welche mit Reinkulturen von Pfeiffer-Bazillen bei Affen eine Erkrankung mit ausgeprägten Influenzasymptomen hervorrufen konnten, doch jedenfalls beweisend sein müßten. Das würde aber zur Voraussetzung haben, daß man durch klinische und anderweitige Untersuchung des einzelnen Influenzakranken mit Sicherheit die Erkrankung als Influenza feststellen kann. Aber das ist nicht der Fall. Man wird wohl ganz allgemein zustimmen, daß dasjenige, welches die echte, d. h. pandemische, Influenza als solche charakterisiert, in erster Linie die eigentümliche epidemisch-pandemische Verbreitungsweise ist. Das Charakteristische ist also die Art des Zusammenhanges zwischen den Erkrankungsfällen, nicht der einzelne Fall, für sich genommen. Natürlich sind die klinischen und pathologisch-anatomischen Beobachtungen auch sehr wichtig, aber als das eigentlich Ausschlaggebende muß doch das epidemiologische Verhalten betrachtet werden.

Es ist ein sehr naheliegender Gedanke, sich auch bei Erwägungen über die mikrobielle Aetiologie in erster Linie mit dem Zusammenhang der Fälle untereinander zu beschäftigen. Daß eine Anzahl von Fällen als Glieder einer zusammenhängenden Epidemie oder Pandemie auftritt, würde dann, vom mikrobiologischen Gesichtspunkte betrachtet, bedeuten, daß das ursächlich beteiligte (primäre) Virus durchaus dasselbe sein muß. Wenn man also dieses Virus aus verschiedenen Krankheitsfällen züchtet, dürften die Stämme nur solche Verschiedenheiten aufweisen, welche durch Veränderung sehr labiler Eigenschaften bedingt

sein können. Solche Eigenschaften hingegen, welche unter natürlichen Verhältnissen nur selten einer Veränderung unterliegen (absolut unveränderliche Eigenschaften gibt es wohl kaum), müßten sich als allgemeine Regel bei den verschiedenen Stämmen als identisch erweisen.

Wir sehen in der Tat auch, daß bei allen epidemisch auftretenden Infektionskrankheiten mit wohlbekannter bakterieller Aetiologie die Stämme der betreffenden ursächlich beteiligten Bakterien gewöhnlich nur sehr geringe Verschiedenheiten aufweisen. (Die Tatsache, daß mehrere verschiedene — serologisch oder anderweitig definierte — Typen innerhalb derselben Bakterienspezies gleichzeitig epidemisch wirksam sein können, ändert nichts an der prinzipiellen Betrachtung.) Wenn man aber Saprophyten oder Bakterien, welche nur gelegentlich oder sekundär infektiöse Prozesse hervorrufen, mit der gleichen Genauigkeit untersucht, wird man im allgemeinen nicht einzelne bestimmte, weitverbreitete Typen finden.

Die Typhus-Paratyphus-Coli-Gruppe kann als charakteristisches Beispiel für diese Verhältnisse dienen: aus der unendlich bunten Gruppe von Tausenden verschiedener Typen heben sich die wenigen hochinfektiösen und darum in besonders charakteristischer Weise weitverbreiteten Typen besonders hervor.

Wie steht es nun mit dem Pfeifferschen Bazillus? Sind die verschiedenen Stämme einander ähnlich, wie es z. B. die aus derselben Paratyphusepidemie gezüchteten Stämme sind, oder bilden sie eine ebenso bunte Gruppe wie die Coli-Gruppe? Ich meine, daß durch die Mitteilungen einer ganzen Reihe von Verfassern schon genügend dargestellt ist, daß das letztere der Fall ist. Die ausführlichsten Untersuchungen über diese Frage sind von verschiedenen amerikanischen Verfassern mitgeteilt worden: Park, Williams u. Cooper, Valentine u. Cooper, Povitzky u. Denny und mehreren andern. In Deutschland haben Seligmann u. Wolff und Bieling und seine Mitarbeiter ähnliche Differenzen zwischen den Stämmen gefunden, in England Maitland u. Cameron u. a., in Norwegen Skajaa.

Die genannten Verfasser haben sich hauptsächlich mit den serologischen Eigenschaften, besonders mit der Agglutination, beschäftigt, was insofern berechtigt ist, als es gewöhnlich leicht ist, mit beliebigen Stämmen recht hochwertig agglutinierende Sera herzustellen, wogegen die Zuckervergärungen bei dieser Bakteriengruppe etwas schwieriger zu handhaben sind, weil sie immer nur recht schwach und oft in hohem Grade von kleinen Verschiedenheiten im Nährboden beeinflußbar sind. Immerhin sind die Untersuchungen von Stillman u. Bourn u. a. recht bezeichnend; die mannigfaltigen Kombinationen verschiedener Gärungsreaktionen, welche angetroffen werden, erinnern durchaus an die entsprechende Mannigfaltigkeit innerhalb der Coli-Gruppe.

Bei meinen früher publizierten Untersuchungen habe ich in bezug auf die Seroreaktionen ganz dasselbe bunte Bild gefunden. Um nur ein einzelnes Beispiel zu nennen: Unter 6 bei derselben Epidemie (1920) aus Influenzapneumonien gezüchteten Stämmen erwiesen nur 2 sich miteinander agglutinatorisch identisch, während die übrigen sowohl untereinander als auch den 2 erstgenannten Stämmen gegenüber spezifisch verschieden reagierten.

Weiterhin habe ich, wie auch Rivers und Skajaa, die individuellen Verschiedenheiten der Stämme in einigen bei dieser Bakteriengruppe sonst nicht viel beachteten Richtungen hervorgehoben: den

makroskopisch erkennbaren Charakter der Kolonien, die Temperaturbedingungen des Wachstums u. a. m. Wenn auch einige dieser Eigenschaften etwas variabel sind, so sind sie doch im ganzen recht charakteristisch für den individuellen Stamm selbst bei jahrelanger Züchtung.

Will man nun näher untersuchen, ob die gefundenen Verschiedenheiten zwischen den verschiedenen Stämmen mit einer epidemiologischen Zusammengehörigkeit unvereinbar sind, so muß man sich natürlich hauptsächlich mit den konstanten Eigenschaften beschäftigen, während die besonders labilen Eigenschaften für diese Frage nicht zu verwerten sind. Zu den letzteren gehören nach der allgemeinen Erfahrung die mikroskopische Morphologie (wenigstens bei den gewöhnlich angewandten Untersuchungsmethoden) und die Virulenz. Es braucht wohl nicht näher ausgeführt zu werden, daß man natürlich nicht daraus, daß irgendeine Eigenschaft sehr labil ist, den Schluß ziehen kann, daß dasselbe auch der Fall mit den übrigen Eigenschaften sein muß.

Die einzigen Eigenschaften, die bisher von mehreren verschiedenen Untersuchern mit positivem Resultat auf Konstanz geprüft worden sind, sind die serologischen (besonders durch Agglutination und Agglutininabsorption untersucht) und die Indolbildung. Fast immer fand man, wenn auch nicht eine absolute, doch eine ebenso weitgehende Konstanz wie bei den meisten andern Bakterien. Die Indolbildung interessiert uns hier insofern weniger, als man im allgemeinen nur zwischen 2 Möglichkeiten unterschieden hat, nämlich zwischen positiver und negativer Reaktion. Von größerem Interesse ist es, sich eingehender mit den serologischen Reaktionen zu beschäftigen. Wenn man die Konstanz dieser (und anderer) Eigenschaften untersuchen will, so kann dies auf folgenden 4 Wegen geschehen:

1) kann man die Konstanz bei langdauernder Züchtung in vitro untersuchen. — 2) kann man die Züchtung in vitro mit experimenteller Tier- oder Menschenpassage kombinieren. — 3) kann man untersuchen, ob der Bazillus, wenn er längere Zeit hindurch aus demselben Organismus (z. B. bei gesunden Bazillenträgern), oder aus verschiedenen Lokalisationen desselben gezüchtet wird, immer dieselben Eigenschaften aufweist. — 4) kann man die Frage bei ihrer natürlichen besonders epidemischen Uebertragung von Mensch zu Mensch verfolgen.

Untersuchungen über das Verhalten des Pfeifferschen Bazillus in den 3 ersten Beziehungen sind von verschiedenen Untersuchern (Park, Williams u. Cooper, Park u. Cooper, Valentine u. Cooper, Povitzky u. Denny, Cecil u. Steffen, Bieling u. Joseph) mitgeteilt worden, die übereinstimmend eine ausgesprochene Konstanz der agglutinatorischen Eigenschaften gefunden haben. Nur Anderson u. Schultz fanden bei der Untersuchung von Pfeiffer-Bazillen, die bei einem Meningitisfall aus Spinalflüssigkeit, Blut, Nase, Rachen und Nasenrachenraum gezüchtet waren, daß sie ausgesprochene Verschiedenheiten aufwiesen und folgerten daraus, daß der Bazillus seine Eigenschaften bei der Wanderung aus einem Teil des Körpers in einen andern schon verändern kann. Leider sind diese Versuche nur recht unvollständig durchgeführt, aber, wie ich schon früher bemerkt habe, ist die Frage von so großer prinzipieller Wichtigkeit, daß solche Untersuchungen so bald wie möglich wiederholt werden sollten.

Die von Schmidt u. Weinberg mitgeteilte Beobachtung analoger Art wird im Zusammenhang mit meinen Untersuchungen näher erörtert werden.

Wenn man die Konstanz bei der natürlichen Uebertragung von Mensch zu Mensch untersuchen will, so muß man sich an solche Infektionen halten, bei denen man annehmen kann, daß der Pfeiffersche Bazillus als selbständiger ätiologischer Faktor auftritt. Es gibt 2 Typen von Infektionen, bei denen diese Annahhme wohl von niemand bestritten wird.

1. Die Pfeiffer-Bazillenmeningitis, die freilich, soweit bekannt ist, nicht in eigentlichen Epidemien auftritt. Immerhin ist es doch beachtenswert, daß Rivers u. Kohn bei der Untersuchung von 13 meningealen Kulturen 7 miteinander identische fanden. Die übrigen bei Pfeiffer-Bazillenmenigitis vorgenommenen Untersuchungen werden weiter unter im Zusammenhang besprochen werden.

2. Die andere Infektion ist die Pfeiffer-Bazillen- oder Koch-Weekssche Conjunktivitis. (Selbst wenn es einen besonderen „echten Koch-Weeks-Bazillus" gäbe, muß ein großer Teil der als „Koch-Weeks-Bazillus" bezeichneten Bakterienbefunde sicher als Pfeiffer-Bazillen betrachtet werden.)

Die einzige mir bekannte Mitteilung von einer Epidemie von Pfeiffer-Bazillen („Koch-Weeks")-Conjunctivitis, bei der die gezüchteten Stämme systematisch serologisch untersucht worden sind, ist die von Schneider mitgeteilte. Die Mehrzahl der aus diesen Conjunctivitisfällen gezüchteten Stämme erwies sich als agglutinatorisch ganz identisch (übrigens auch identisch mit 2 Pfeiffer-Bazillenstämmen anderer Herkunft). Nur eine Gruppe von Stämmen nahm eine Sonderstellung ein, und diese stammten alle aus demselben Kindergarten. Diese Untersuchung deutet darauf hin, daß, sobald der Pfeiffersche Bazillus selbständig als epidemisches Virus auftritt, die zu derselben Epidemie gehörigen Stämme miteinander ganz identisch sind.

Es scheint mir somit, daß die bisher bekannten Untersuchungen im ganzen sehr ungünstig sind für die Annahme, daß der Pfeiffersche Bazillus als spezifisches Influenzavirus anzusehen ist. Es muß jedoch zugegeben werden, daß es wünschenswert ist, daß die verschiedenen erwähnten Einzelfragen in noch größerer Ausdehnung untersucht werden. Die Ergebnisse müssen dann natürlich ganz objektiv mitgeteilt werden, insbesondere dürfen auch nicht solche Befunde verschwiegen werden, deren Verwertung für die vorliegende Frage vorläufig unsicher ist.

II. Eigene Untersuchungen.

1.

Zunächst soll eine in einer früheren Mitteilung (Christiansen u. Kristensen) kurz erwähnte Untersuchung in ausführlicher Form mitgeteilt werden:

Am. 23. 2. 1920 wurden aus der Spinalflüssigkeit des 2jährigen meningitiskranken Knaben N. H. N. in Reinkultur Bazillen gezüchtet, welche außer durch die mikroskopischen Untersuchungen durch das makroskopische Aussehen der Kulturen auf Fildes-Agar (Agar mit Zusatz von pepsinverdautem Blut) und Blutagar, durch fehlende Hämolyse auf Blutagar, durch fehlendes Wachstum auf blutfreiem Agar und durch positive Symbiosereaktion als Pfeiffersche Bazillen verifiziert wurden. (Alle in folgendem erwähnten Pfeiffer-Bazillenstämme sind in derselben Weise untersucht worden.) Während der Rekonvaleszenz wurden 6mal (13. 1., 23. 1., 30. 1., 6. 2., 11. 2. und 20. 2.) Rachenabstriche auf Fildes-Agarplatten untersucht. Jedesmal fanden sich Kolonien von Pfeiffer-Bazillen, bei den ersten 4 Züchtungen in reichlicher Menge, bei den letzten 2 nur spärlich. Es ist beachtenswert, daß das (makroskopische) Aussehen der Kolonien und

Kulturmassen bei den verschiedenen Stämmen ganz identisch war; die Kolonien waren größer als bei der Mehrzahl der Pfeiffer-Bazillenstämme, von ganz weicher Konsistenz und einem ganz bestimmten halbdurchsichtigen Aussehen.

Nun wurde mittels des Spinalstammes ein agglutinierendes Kaninchenserum hergestellt; bei mehrmals wiederholten Versuchen agglutinierte dieses Serum die verschiedenen Rachenkulturen ganz in der gleichen Weise wie den homologen Stamm. Ein Anfang März angestellter Versuch gab die folgenden Reaktionen [+ = vollständige Agglutination, (+) = unvollkommene Agglutination].

	Serumverdünnungen					
	1:25	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800
Spinalstamm	+	+	+	+	(+)	0
Rachenstamm vom 13. 1	+	+	+	+	0	0
„ „ 23. 1.	+	+	+	+	0	0
„ „ 30. 1.	+	+	+	+	0	0
„ „ 6. 2.	+	+	+	+	0	0
„ „ 11. 2.	+	+	+	+	0	0
„ „ 20. 2.	+	+	+	+	0	0

(Die unbedeutend stärkere Agglutination des Spinalstammes wurde nicht konstant beobachtet.)

Mit den 3 ersten Rachenstämmen wurden Absorptionsversuche gemacht. Diese wurden in einer Serumverdünnung 1:15 mit einer nicht besonders großen Kulturkonzentration angestellt (5mal die Kulturkonzentration, durch die man, wenn sie sich in einem Reagenzglas von 10 mm Durchm. befindet, gerade noch Buchstaben lesen kann). Nach 2stünd. Aufenthalt der Mischung bei Zimmertemperatur wurde zentrifugiert. Jedesmal wurden mindestens $^7/_8$ der Agglutininmenge (dem Spinalstamm gegenüber geprüft) entfernt.

Somit konnten bei den angewandten Untersuchungsmethoden gar keine Unterschiede zwischen den 7 Stämmen beobachtet werden.

2.

Die nächste in der Literatur bisher erwähnte Untersuchung analoger Art wurde von Schmidt u. Weinberg mitgeteilt. Es handelt sich um 3 Stämme von Pfeiffer-Bazillen, die aus dem Liquor eines meningitiskranken Kindes Ch. D., aus dem Rachen desselben Kindes und aus dem Rachen seiner Mutter gezüchtet waren. Ein Kaninchen wurde mit dem Spinalstamm immunisiert. Das Kaninchenserum agglutinierte die 2 anderen Stämme bedeutend schwächer als den Spinalstamm. Da es ja von vornherein als sehr wahrscheinlich angesehen werden mußte, daß die 3 Stämme genetisch identisch waren, war es natürlich, dieses Ergebnis im Sinne einer Aenderung der Agglutinabilität des Bazillus durch seine Wanderung vom Rachen der Mutter in den Rachen des Kindes und von dort weiter in seine Spinalflüssigkeit zu deuten. Wegen Mangels an Versuchstieren konnte die Sache jedoch vorläufig nicht weiter betrieben werden.

Herr Prof. Schmidt hat mir nun in sehr liebenswürdiger Weise diese 3 Stämme zur weiteren Untersuchung überlassen. Für das Vertrauen, das er mir hierdurch geschenkt hat, möchte ich ihm auch an dieser Stelle meinen aufrichtigen Dank aussprechen.

Ich ging sofort daran, Kaninchen zu immunisieren, sowohl mit diesen 3 Stämmen als auch mit einem 4. Stamm von Prof. Schmidt, nämlich dem in der Mitteilung von Hildegard Lemm erwähnten kokkoiden Stamm „Sch."

Der Kürze halber werde ich die folgenden Bezeichnungen für die 3 erstgenannten Stämme benutzen:

L = Liquor des Kindes, R = Rachen des Kindes, M = Rachen der Mutter.

Am 30. 10. 23 wurden mit den erhaltenen Seren kreuzweise Agglutinationsversuche gemacht, die alle in den Verdünnungen 1:25, 50, 100, 200, 400, 800 und 1600 angestellt wurden.

Kulturen	Sera L	Sera R	Sera M	Sera Sch
L	1:1600	1:1600	1:1600	0
R	1:1600	1:1600	1:1600	0
M	1:1600	1:1600	1:1600	0
Sch	0	0	0	1:1600

(1:1600 = starke Agglutination in der ganzen Serie, 0 = gar keine Agglutination.) Der Stamm Sch. diente sowohl hier als auch bei den weiter unten erwähnten Absorptionsversuchen als Kontrolle für die enge Spezifizität der Reaktionen.

Leider wurden die Titergrenzen nicht erreicht. Nach den bei anderen Versuchen mit den gleichen Sera und Stämmen erhobenen Titern zu urteilen, würde die Agglutination bei weiterer Austitrierung nicht viel weiter gegangen sein, und die mit den Sera und Kulturen, L, R und M angestellten 9 Agglutinationsserien hatten ein sehr gleichförmiges Gepräge. Weiterhin wurde die agglutinatorische Identität der 3 Stämme durch den folgenden am 1. 11. angestellten Absorptionsversuch bestätigt. Die Absorptionsversuche wurden in Serumverdünnungen 1:40 angestellt, im übrigen mit der schon erwähnten Technik. Für die Agglutinationsversuche wurden 4 Teile der abzentrifugierten Serumverdünnung mit 1 Teil einer passend konzentrierten Kulturaufschwemmung gemischt.

(Abkürzungen: S_L + L = einfacher Agglutinationsversuch mit Serum L und Stamm L; S_L, R + L = das Serum L wurde mit Stamm R absorbiert und nach Abzentrifugierung der Kultur im Agglutinationsversuch dem Stamm L gegenüber geprüft usw.; + = vollständige Agglutination, (+) = unvollständige Agglutination.)

	Serumverdünnungen 1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600
S_L + L	+	+	+	+	+	+
S_L,L + L	(+)	0	0	0	0	0
S_L,R + L	0	0	0	0	0	0
S_L,M + L	(+)	0	0	0	0	0
S_L,Sch + L	+	+	+	+	+	+
S_M + M	+	+	+	+	+	+
S_M,L + M	(+)	0	0	0	0	0
S_M,R + M	0	0	0	0	0	0
S_M,M + M	0	0	0	0	0	0
S_M,Sch + M	+	+	+	+	+	(+)
S_R + R	+	+	+	+	+	+
S_R,L + R	(+)	0	0	0	0	0
S_R,R + R	0	0	0	0	0	0
S_R,M + R	0	0	0	0	0	0
S_R,Sch + R	+	+	+	+	+	+
S_{Sch} + Sch	+	+	+	+	+	+
S_{Sch},L + Sch	+	+	+	+	+	+
S_{Sch}.R + Sch	+	+	+	+	+	(+)
S_{Sch},M + Sch	+	+	+	+	+	+
S_{Sch},Sch + Sch	+	0	0	0	0	0

Es war also nicht möglich, bei den Versuchen irgendwelche agglutinatorischen Verschiedenheiten zwischen den Stämmen zu finden.

Die Kulturen wurden das folgende Vierteljahr hindurch in halbflüssigem Fildes-Agar (vielleicht auch einmal auf „Schokoladenagar“

= gekochtem, unfiltriertem Blutagar) mit Ueberschichtung von Paraffinöl weitergezüchtet durch Uebertragung mit 2—4wöchentlichen Zwischenräumen und kontinuierlichem Aufenthalt im Brutschrank zwischen den Umzüchtungen.

Am 30. 1. 24 wurden die Stämme L, R und M aufs neue im gekreuzten Agglutinationsversuch geprüft. Die Serumverdünnungen waren 1:50, 100 usw. bis 3200.

Kulturen	Sera L	Sera R	Sera M
L	+ + + 0 0 0 0	+ + + 0 0 00	+ 0 0 0 0 0 0
R	+ + + + + 0 0	+ + + + + 00	+ + + + + (+) 0
M	+ + + + + 0 0	+ + + + + +0	+ + + + + 0 0

Der Stamm L hatte also einen großen Teil seiner Agglutinabilität eingebüßt, während R und M im wesentlichen ihre ursprüngliche Agglutinabilität beibehalten hatten.

In Uebereinstimmung hiermit zeigten einige orientierende Absorptionsversuche, daß, während die Stämme R und M ihre ursprüngliche absorbierende Fähigkeit allen 3 Sera gegenüber beibehalten hatten, dieses bei dem Stamm L nicht der Fall war.

Nun wurden Kulturen der 3 Stämme auf je eine Platte dünn ausgesät und von jeder Platte 20 Kolonien auf einen Teil einer neuen Platte weitergezüchtet, so daß aus jeder Kolonie eine für einen Agglutinationsversuch genügende Kulturmenge herauskam. Jede dieser 60 Kulturen wurde mit allen 3 Seren geprüft in passend gewählten Verdünnungen in der Umgebung der eben gefundenen Titergrenze. Die Kulturen aus dem Stamm L wurden mit Serum L und R in den Verdünnungen 1:100, 200 und 400 geprüft, mit dem Serum M in der Verdünnung 1:50, 100 und 200, die Kulturen der Stämme R und M mit allen 3 Sera in den Verdünnungen 1:400, 800 und 1600.

Der Raumersparnis halber werden in der Wiedergabe dieses Versuches und der folgenden die Abkürzungen benutzt:

0 = keine Agglutination in den angestellten Verdünnungen,
1 = unvollständige Agglutination in der Verdünnung 1:50,
2 = vollständige Agglutination in der Verd. 1:50, keine in der Verd. 1:100.
3 = „ „ „ „ „ 1:50, unvollst. in der Verd. 1:100.
4 = „ „ „ „ „ 1:100, keine in der Verd. 1:200 usw. bis
12 = „ „ noch in der Verdünnung 1:1600.

	Stamm L mit Serum L	R	M	Stamm R mit Serum L	R	M	Stamm M mit Serum L	R	M
1	3	4	1	9	11	10	10	11	11
2	4	4	2	9	11	10	9	11	10
3	4	5	1	9	11	10	11	11	11
4	4	4	1	9	11	10	10	10	10
5	4	4	2	9	10	11	9	11	10
6	3	5	2	10	10	11	10	10	10
7	4	**6**	4	9	11	10	11	12	11
8	**0**	**3**	2	10	11	10	9	12	10
9	4	5	3	9	11	10	11	12	11
10	4	5	3	9	10	10	10	11	11
11	4	5	2	8	10	10	9	11	10
12	4	6	2	8	10	10	11	11	10
13	4	4	2	9	10	10	10	11	10
14	4	4	1	9	11	10	10	11	11
15	**6**	5	**6**	9	11	10	10	11	10
16	4	5	1	8	11	10	10	12	11
17	4	4	1	9	11	10	.	.	7
18	4	4	1	9	11	10	10	11	10
19	4	5	2	9	11	10	11	11	11
20	4	5	1	9	11	10	.	.	7

Man kann hier unterscheiden zwischen den kleinen Variationen „zufälligen“ Charakters und einigen besonderen Fällen, in denen die betreffenden Kulturen in einer von den übrigen Kulturen desselben

Stammes stärker abweichenden Weise reagierten. Diese abweichenden Reaktionen sind durch fettgedruckte Ziffern hervorgehoben.

Man sieht, daß alle 40 Kulturen aus den Stämmen R und M bis auf 2 (Stamm M, Nr. 17 und 20) identisch reagierten, und daß alle Kulturen vom Stamm L schwächer agglutiniert wurden als irgendeine andere Kultur der 2 anderen Stämme. Die Kulturen 7 und 15 des Stammes L scheinen durch relativ stärkere Agglutination, die Kultur 8 durch besonders schwache Agglutination von den übrigen L-Kulturen abzuweichen. Es ist beachtenswert, daß gerade die agglutinatorisch abweichenden Kulturen 17 und 20 des Stammes M bedeutend schwächer als die übrigen Kulturen wuchsen, so daß die Kulturen nur für je eine Agglutinationsserie ausreichten. Bei den übrigen 58 Kulturen konnten vorläufig keine sicheren Unterschiede des Wachstums beobachtet werden. Jedoch zeigte es sich bei den fortgesetzten Züchtungen, daß die von dem Stamm L herrührenden Kulturen etwas schwächer wuchsen als die R- und M-Kulturen. Es bestand so ein regelmäßiger Zusammenhang zwischen verminderter Wachstumsenergie und verminderter Agglutinabilität.

Von den abweichenden Kulturen und zum Vergleich von einigen der nicht abweichenden wurden nun neue Aussaaten gemacht und aus einer Anzahl isolierter Kolonien für neue Agglutinationsversuche weitergezüchtet. Von den abweichenden Kulturen wurden je 5 Subkulturen, von den nicht abweichenden nur 2 untersucht. Die Versuche wurden mit den Sera L und M in den Verdünnungen 1:100, 200, 400, 800 und 1600 angestellt.

Stamm	Serum		Stamm	Serum		Stamm	Serum		Stamm	Serum	
L	L	M	L	L	M	M	L	M	M	L	M
2,1	3	0	2	0	0	17,1	0	5	19,1	7	8
2	6	5	3	0	0	2	3	4	2	8	8
5,1	6	6	4	0	0	3	4	5	20,1	3	5
2	7	6	5	0	0	4	4	6	2	5	6
7,1	4	0	15,1	7	7	5	3	5	3	0	3
2	4	0	2	7	6	18,1	7	10	4	4	4
3	5	0	3	7	6	2	7	9	5	4	4
4	4	0	4	6	6						
5	4	0	5	4	5						
8,1	0	0									

Wir sehen hier ein recht buntes Bild mit mehreren verschiedenen Variationen, welche jedoch nicht weiter verfolgt wurden.

Alle Subkulturen von L 8 hatten die ausgesprochene Hypagglutinabilität beibehalten. Die 1. dieser Kulturen (also L 8,1) wurde nun in halbflüssigem Fildes-Agar weitergezüchtet.

Die Subkulturen von L 7 und L 15 wurden dagegen nicht stärker agglutiniert als diejenigen von L 5 (die ja von der Mehrzahl der L-Kulturen nicht abwich). Immerhin war es doch denkbar, daß man durch fortgesetzte Auslese aus der am besten agglutinierenden Kultur, L 15,1, schließlich eine Kultur mit der ursprünglichen Agglutinabilität erhalten konnte. Sie wurde darum noch einmal ausgesät, und es wurden 20 isolierte Kolonien für Agglutinationsversuche weitergezüchtet.

Die Agglutination wurde in den Verdünnungen 1:100 bis 1:1600 geprüft. Alle 20 Kulturen wurden in den 2 ersten Verdünnungen vollständig agglutiniert, in der 2. Verdünnung (1:400) entweder gar nicht oder mehr oder weniger unvollständig, in den letzten 2 Verdünnungen gar nicht. Es fanden sich also nur ganz unbedeutende Schwankungen.

Von einer der am besten agglutinierenden Kulturen, als L 15,1, 6 bezeichnet, wurde in der gleichen Weise weitergezüchtet, und es wurden 20 Subkulturen wie im vorigen Versuche agglutinatorisch geprüft. Eine Kultur wurde gar nicht agglutiniert, die übrigen 19 wurden ganz wie im vorigen Versuch agglutiniert.

Von der am besten agglutinierenden Kultur (vollständige Agglutination in der Verdünnung 1:100 und 1:200, feine Agglutination bei 1:400), als 15,1, 6, 6 bezeichnet, wurde eine ganze Platte beimpft und von dieser 6 andere Platten. Die Kulturen dieser 6 Platten wurden abgeschabt und eine Aufschwemmung der gesamten Kulturmenge wurde hergestellt. Gleichzeitig waren auch die Stämme R und M ausgesät worden, und alle Kulturen wurden für Agglutinations- und Absorptionsversuche verwandt. Im direkten Agglutinationsversuch reagierte die Kultur L 15,1 6, 6 in ganz derselben Weise wie vor den Reinigungsversuchen, allen 3 Sera gegenüber wesentlich schwächer als die Kulturen der Stämme R und M. Ebenso hatte sie keine oder geringe absorbierende Fähigkeit gegenüber den für R und M wirksamen Agglutininen der 3 Sera.

Die Veränderung des Stammes L konnte also durch die Ausleseversuche nicht rückgängig gemacht werden.

Handelt es sich nun nur um eine rein quantitative Herabsetzung der Agglutinabilität und Absorptionsfähigkeit, oder war eine qualitative Aenderung eingetreten?

Um diese Frage näher zu untersuchen, wurden Kaninchen mit den Stämmen L 8,1 und L 15,1, 6, 6 immunisiert und mit den Sera Anfang April die folgenden gekreuzten Agglutinations- und Absorptionsversuche angestellt. (Abkürzungen: 8 = L 8,1, 15 = L 15,1, 6,6.)

Einfache Agglutination (Serumverdünnung 1:50 bis 1:1600).

Kulturen	Sera L	R	M	8	15
R	8	9	8	5	5
M	9	9	8	5	6
8	3	3	0	7	7
15	5	3	4	5	7

Man sieht schon hier eine deutliche Sonderung zwischen 2 qualititiv verschiedenen Gruppen: einerseits R und M, andererseits 8 und 15. Dasselbe geht aus den gleichzeitig angestellten Absorptionsversuchen hervor:

S_R,R + R: 2	S_M R + M: 2	S_8,R + 8: 4	S_{15}, R + 15: 1
S_R,M + R: 0	S_M -- + M: 0	S_8,M + 8: 6	S_{15}, M + 15: 4
S_R,8 + R: 8	S_M, 8 + M: 8	S_8, 8 + 8: 2	S_{15},→ 8 + 15: 0
S_R,15 + R: 8	S_M, 15 + M: 7	S_8,15 + 8: 2	S_{15},→15 + 15: 0

Die 2 Stämme innerhalb jeder der 2 Gruppen sind offenbar als identisch zu betrachten.

Eine gewisse Zusammengehörigkeit zwischen den 2 Gruppen ist erkennbar, indem die Stämme R und M einen großen Teil des Agglutinins der Sera 8, 15 absorbierten; dagegen absorbierten die Stämme 8 und 15 nur einen sehr kleinen Teil des Agglutinins der Sera R und M. Es muß jedoch bemerkt werden, daß auf Grund des spärlichen Wachstums der Kulturen 8 und 15 diese für die Absorptionsversuche in etwas geringerer Konzentration als R und M verwandt wurden.

Um diese Fehlerquelle auszuschalten, wurden die in obenstehender Tabelle im linken unteren und rechten oberen Quadrat angeführten Versuche mit neuen Kulturen wiederholt und die Kulturen bei allen Absorptionsgemischen in einer möglichst gleichen Konzentration verwandt.

$S_R + R$: 11	$S_M + M$: 11	$S_8 + 8$: 11	$S_{15} + 15$: 11
$S_{R,8} + R$: 11	$S_{M,8} + M$: 11	$S_{8,R} + 8$: 9	$S_{15,R} + 15$: 6
$S_{R,15} + R$: 10	$S_{M,15} + M$: 10	$S_{8,M} + 8$: 9	$S_{15,M} + 15$: 6

Die beiden Serien stimmen sehr gut überein; es ist also klar, daß ein „schiefes Verhältnis“ besteht: während der geänderte Stamm (denn 8 und 15 sind ja im wesentlichen als identisch zu betrachten) das „ursprüngliche“ Serum kaum absorbieren kann, bleibt dem ursprünglichen Stamm noch eine, wenn auch verminderte, doch nicht unbedeutende Absorptionsfähigkeit den Sera der abgespaltenen Stämme gegenüber. Weitere Erwägungen über die „Struktur“ der 2 Rezeptorenkomplexe auf der vorliegenden Grundlage sind wohl müßig.

Diese Untersuchung der 3 Stämme hat also gezeigt, daß sie sich bei nicht zu lange nach der Isolierung vorgenommener Untersuchung identisch erwiesen, daß aber bei fortgesetzter Züchtung mehr oder minder tiefgehende Variationen auftreten. — Die von Schmidt u. Weinberg angestellten Agglutinationsversuche waren freilich früher als die ersten der meinigen vorgenommen worden; hierin liegt aber kein Widerspruch, denn, wie Prof. Schmidt mir brieflich mitgeteilt hat, waren die mir übersandten Kulturen nicht von den zu den Agglutinationsversuchen benutzten weitergezüchtet worden, sondern von den gleichen Stammkulturen, von denen Kulturen für die Agglutinationsversuche abgezweigt wurden. Die Veränderung der in Prof. Schmidts Laboratorium abgezweigten Kulturen muß also aus irgendeinem Grunde schneller eingetreten sein, als bei den hier vorgenommenen Weiterzüchtungen.

Die gefundenen Variationen sind aller Wahrscheinlichkeit nach echte und nicht nur der Ausdruck von ursprünglich gemischten Kulturen. Zwar sind Einzelkulturen nicht gemacht. Dieses würde sicher wegen der Kleinheit und geringen Widerstandsfähigkeit des Pfeifferschen Bazillus nicht nur auf technische Schwierigkeiten stoßen, sondern auch kaum zu einem absolut verläßlichen Ergebnis führen können, denn man trifft ja hier oft Bakterienindividuen, die noch viel kleiner sind als die Mehrzahl der Individuen und somit bei den gebräuchlichen Isolierungsverfahren außerordentlich leicht übersehen werden können. Aus den weiter unten näher besprochenen Indolreaktionen ergibt sich aber eine große Wahrscheinlichkeit für einen gemeinsamen Ursprung der verschiedenen Varianten.

3.

Im Januar 1924 wurden sowohl aus dem Liquor wie aus dem Blute eines meningitiskranken Mädchens, R. G. H., Pfeiffersche Bazillen in Reinkultur gezüchtet. Der Fall ist von M. Siggaard Andersen in der dänischen Ugeskrift for Læger mitgeteilt worden. Jedoch hat er mir diese Stämme für weitere Untersuchungen überlassen, wofür ich ihm bestens danke.

Nach wenigen Umzüchtungen wurde sowohl mit dem Liquorstamm (A) als auch mit dem Blutstamm (B) ein Kaninchen immunisiert. Inzwischen wurde mit den 2 Kulturen Mäusepassage versucht, und um ein Vergleichsmaterial für die folgenden Untersuchungen zu haben, wurden

gleichzeitig 4 andere Kulturen herangezogen, nämlich die obenerwähnte Kultur R, eine 1920 isolierte Kultur aus Influenzapneumonie (I 33), eine andere 1919 bei Influenza gezüchtete Kultur (I 91) und eine 1920 isolierte meningeale Kultur (Me 2). Es kann hier bemerkt werden, daß ich bei einer Anzahl im Laufe der Jahre gelegentlich vorgenommener Impfungen von Kaninchen und Mäusen mit verschiedenen Pfeiffer-Bazillenkulturen niemals eine eigentliche Virulenz habe konstatieren können, weder bei meningealen Stämmen noch bei solchen aus den Respirationsorganen. Trotzdem wollte ich versuchen, um die Konstanz der Kulturen auch durch Tierpassage zu prüfen, die Züchtungen in vitro mit Mäusepassage zu kombinieren. Bei vorläufigen Versuchen zeigte sich die intraperitoneale Injektion von Fildes-Agarkulturen von A und B wirkungslos. Wenn gleichzeitig eine virulente Pneumokokkenkultur injiziert wurde, starben die Mäuse an reiner Pneumokokkensepsis, ohne daß Pfeiffer-Bazillen im Blute nachgewiesen werden konnten. Endlich wurden die schon erwähnten 6 Stämme A, B, R, I 33, I 91 und Me 2 als Schrägagarkulturen auf „Schokoladenagar" gezüchtet. Nach 40stünd. Bebrütung wurden die gut gewachsenen Kulturmassen in Kondenswasser aufgeschwemmt. Zu dieser sehr stark konzentrierten Aufschwemmung wurde ein Tropfen Schafblut hinzugefügt und aus jeder Kultur 0,1 ccm eines solchen Gemisches einer Maus intraperitoneal injiziert. Trotz der sehr großen verabfolgten Kulturmenge blieben die mit den 2 letztgenannten Kulturen geimpften Mäuse am Leben, die andern 4 starben nach 10 bis 24 Std.

Ein Tropfen Herzblut von jeder der 4 Mäuse wurde auf Fildes-Agarplatten ausgestrichen. Von den Kulturen A, B und R entwickelten sich mehrere Tausend Kolonien von der Kultur J 33 ungefähr 100.

Natürlich kann dieses Uebertreten der Bazillen ins Blut nicht als Ausdruck einer eigentlichen Virulenz aufgefaßt werden, sondern es ist wohl nur durch eine mehr passive Resorption eines Teiles der großen injizierten Bazillenmenge zu erklären. Es gelang auch nicht, mit dem Herzblut weitere Mäuse zu infizieren.

Bei Betrachtung der 4 Platten war ein sehr charakteristisches individuelles Gepräge von Stämmen verschiedener Herkunft unverkennbar. Die mit den Stämmen A und B beimpften Platten waren einander vollkommen ähnlich. Ebenso wie die im Abschnitt 1 erwähnten Stämme waren die Kolonien üppiger als die Mehrzahl von Pfeiffer-Bazillen. Sowohl auf der A-, als auch auf der B-Platte konnten 2 verschiedene Arten von Kolonien beobachtet werden: hellere und dunklere, die jedoch einander so ähnlich waren, daß man sie nur dann mit Sicherheit voneinander unterscheiden konnte, wenn sie nebeneinander auf derselben Platte wuchsen. Nach 2—3tägigem Aufenthalt im Thermostaten trat in den dunklen Kolonien, wenn sie einigermaßen freistehend lagen, eine eigentümliche radiäre Streifung auf, und die Kolonie bestand dann aus schmalen, abwechselnd dunklen und hellen Sektoren in unregelmäßiger Anordnung. Diese radiäre Streifung fehlte bei den hellen Kolonien.

Im Gegensatz zu dem üppigen Wachstum der Stämme A und B waren die Kolonien auf der R-Platte (ebenso wie es vorher immer bei den L-, R- und M-Kulturen beobachtet worden war) kleiner, als es Pfeiffer-Bazillen durchschnittlich sind; hier konnte nur ein Typus beobachtet werden. Das relativ üppige Wachstum ist also durchaus kein konstantes Charakteristikum von meningitiserregenden Stämmen.

Endlich bestand die Mehrzahl der Kolonien von Stamm J 33 aus recht großen Kolonien mit einem flachen, stark gebuchteten Rand. Diese Erscheinung war freilich bei einigen Kolonien weniger ausgesprochen; es fanden sich aber kontinuierliche Uebergänge zwischen diesen und den Kolonien mit stark ausgebildetem Rand, und wenn man in parallelen Strichen auf eine neue Platte weiterimpfte, entwickelte die Randbildung sich immer in der gleichen Weise. Der Stamm muß darum bezüglich der Kolonieform durchaus als monomorph bezeichnet werden.

Es muß hervorgehoben werden, daß die hier beschriebenen Charakteristika der Kolonien jedes Stammes die ganze Zeit hindurch beobachtet wurden, in der mit den betreffenden Stämmen experimentiert wurde. Der Stamm I 33 war seit 4 Jahren kultiviert worden, und soviel aus früheren Notizen ersichtlich ist, hatte er die ganze Zeit hindurch dieselbe Neigung zu der beschriebenen Randbildung der Kolonien und Kulturen gehabt. Die Kolonien auf der Originalplatte (31. 1. 1920) wurden als „groß, mit leicht gebuchtetem Rand" beschrieben, im Oktober 1920 wurde die Kultur als eine der am stärksten randbildenden angeführt.

8 Kolonien von jeder der 4 Platten wurden auf einer Platte ausgestrichen, von jeder der Platten A und B wurden 4 dunkle und 4 helle Kolonien genommen.

Die von den hellen Kulturen aus den Stämmen A und B stammenden neuen Kolonien waren sämtlich hell, aus den dunklen Kolonien entwickelten sich vorwiegend dunkle Kolonien. In 2 oder 3 Kulturen wurden aber auch einzelne helle Kolonien (ganz identisch mit den übrigen hellen Kolonien) beobachtet. Wahrscheinlich enthielten alle 8 „dunklen" Kulturen helle Kolonien, sie konnten aber nur in einem kleinen Teil der besäten Fläche, wo die Kolonien wenig gedrängt standen, von den dunklen Kolonien unterschieden werden. Es scheint, daß die in hellen Kolonien wachsende Form stabil ist, während die dunklen Kolonien immer wieder aufs neue helle Kolonien abspalten. Einige fortgesetzte Reinigungsversuche bestätigten diese Annahme.

In Ausstrichpräparaten konnten keine morphologischen Unterschiede zwischen dunklen und hellen Kolonien beobachtet werden.

In 2 der Kulturen von Stamm R fand sich je 1 Kolonie, die eine von dem übrigen Teil scharf abgeschnittene, dunkle Partie enthielt. Es gelang indessen nicht, diese dunkle Form reinzuzüchten.

Bei den Kulturen von Stamm I 33 konnte, wie früher, keine Dimorphie der Kolonien beobachtet werden.

Aus jeder der 32 Kulturen wurden (in 2 Etappen) Fildes-Agarplatten für Agglutinations- und Absorptionsversuche besät, auch die nicht „gereinigten" Stämme wurden ausgesät.

Alle A- und B-Kulturen (im ganzen also 18) wurden sowohl mit dem Serum A, als auch mit dem Serum B im Agglutinationsversuch geprüft, bzw. in den Verdünnungen 1:200, 400, 800, 1600 und 1:100, 200, 400, 800. Die Kulturen variierten etwas in ihrer Agglutinabilität. Die am wenigsten agglutinable wurde nur in der 1. Verdünnung agglutiniert, die am stärksten agglutinable in den 3 ersten Verdünnungen. Die Kulturen aus den hellen Kolonien waren im ganzen, aber nicht ausnahmslos, weniger agglutinabel als diejenigen aus den dunklen Kolonien. Die Agglutinabilität den 2 Sera gegenüber lief im wesentlichen überall parallel.

Es wurden nun Absorptionsversuche gemacht, indem in 18 Portionen von jedem Serum, 1 :40 verdünnt, je eine der 18 Kulturen verrieben wurde, jedoch mit einzelnen Ausnahmen, in denen die betreffenden Platten zufälligerweise infiziert waren und darum nicht verwandt werden konnten. Die abzentrifugierten Sera wurden in der Verdünnung 1 :50 mit 3, ohne besondere Regel gewählten, Kulturen geprüft, jedoch so, daß bei den Versuchen mit Serum A nur A-Kulturen für die Agglutinationsversuche benutzt wurden, einerlei, ob mit A oder B-Kulturen absorbiert worden war, und in analoger Weise mit Serum B. (Es würde zu weit führen, die Versuche in ihren Einzelheiten wiederzugeben.) Als Kontrolle wurden gleichzeitig mit beiden Seren Absorptionsversuche mit den Stämmen R und I 33 gemacht; hier wurden die Seren auch weiter austitriert.

Sämtliche mit Serum B angestellten Absorptionsversuche fielen positiv aus (d h. in keinem Falle Agglutination). Dasselbe war auch bei der Mehrzahl der Versuche mit Serum A der Fall, während hier jedoch in einigen Fällen Agglutination eintrat. In den Kontrollversuchen wurde keine Absorption beobachtet.

Die Versuche wurden in denjenigen Kombinationen wiederholt, in denen die Absorption unvollständig gewesen war. Dieses Mal wurden größere Kulturkonzentrationen als im vorigen Versuch verwendet. Die Kulturen, deren Agglutination geprüft werden sollte, wurden gleichzeitig mit dem unabsorbierten Serum untersucht. Es handelte sich um 4 Kulturen, von denen 3 bis 1:400 agglutinierten, der 4. bis 1:200. Nach der Absorption trat in der Serumverdünnung 1:50 keine Agglutination ein. Somit war der weitaus größte Teil des Agglutinins entfernt worden. Als Kontrolle diente ein Versuch mit J 33 in ebenso großer Konzentration als „absorbierende" Kultur. Das Serum wurde nach der Absorption mit der oben erwähnten Kultur geprüft, die mit dem unabsorbierten Serum bis 1:200 agglutinierte. Es trat hierin gar keine Aenderung ein. Der Stamm I 33 wurde übrigens bei früher angestellten, direkten Agglutinationsversuchen mit den Seris A und B fast ebenso stark agglutiniert, wie die A- und B-Kulturen. Wenn er trotzdem unter den vorliegenden Versuchsbedingungen gar keine nachweisbare Absorption entfalten konnte, muß die bei allen A- und B-Kulturen beobachtete Absorptionsfähigkeit als Ausdruck einer sehr engen, agglutinatorischen Zusammengehörigkeit angesehen werden. Speziell muß bemerkt werden, daß die Kulturen aus hellen und diejenigen aus dunklen Kolonien sich agglutinatorisch identisch erwiesen, denn bei einer Anzahl der Absorptionsversuche wurde mit einer „dunklen" Kultur absorbiert und mit einer „hellen" agglutiniert, oder umgekehrt. Eine Kultur aus dem einen Kolonientypus konnte also ebenso gut die agglutinierende Fähigkeit des Serums für eine Kultur vom andern Typus aufheben, wie für eine Kultur desselben Typus.

Auch mit den Seris R und I 33 und mit den zu jedem Serum gehörigen 9 Kulturen wurden in ähnlicher Weise Agglutinations- und Absorptionsversuche angestellt. Die direkten Agglutinationen fielen bei den R-Kulturen außerordentlich gleichmäßig aus, und bei I 33 fanden sich nur unbedeutende Schwankungen (Titer 1:200—1:400) zwischen den verschiedenen Kulturen. Die Absorptionsversuche fielen überall positiv aus. Das für I 33 benutzte Serum war vor fast 4 Jahren hergestellt worden und agglutinierte ursprünglich den homologen Stamm

bis etwa 1:200. Die spezifische Agglutinabilität des Stammes war also durch so lange dauernde Züchtung nicht herabgesetzt worden.

Gleichzeitig mit der Aussaat für die Agglutinationsversuche wurden die gleichen 32 Kolonien in eine Lösung von trypsinverdautem Kaseïn mit Zusatz von pepsinverdautem Blut ausgesät. Nach 3tägiger Bebrütung wurde die Indolreaktion angestellt, indem das Ehrlichsche Indolreagens (Paradimethylamidobenzaldehyd 4 g, 96proz. Alkohol 380 ccm, konz. Salzsäure 80 ccm) einfach überschichtet wurde. Trotzdem die verschiedenen Gläser in recht zufälliger Weise beimpft worden waren (nämlich mit gerader Platinnadel, wodurch natürlich recht verschiedene Kulturmengen in die Röhrchen gebracht werden können), und trotzdem keine besondere Sorgfalt bei dem Ueberschichtungsprozeß beobachtet worden war (das eine Mal wurde die Mischung der Flüssigkeiten an der Grenzfläche etwas stärker als das andere Mal), ergab der Versuch eine außerordentliche Regelmäßigkeit der Resultate: Alle 16 A- und B-Kulturen gaben eine schwache hellrote Farbe an der Grenzfläche, alle 8 R-Kulturen eine hellrote, aber doch etwas stärkere Farbe, und alle 8 **I** 33-Kulturen eine sehr viel stärkere, dunkelrote Farbe. Innerhalb jeder der 3 Gruppen mußten die Reaktionen als ganz identisch beurteilt werden. Um jede Möglichkeit einer subjektiven Täuschung bei der Beurteilung auszuschalten, wurden 9 Gläser innerhalb der 1. und 7 Gläser innerhalb der 2. Gruppe[1]) von einem Kollegen umnumeriert und in beliebiger Weise durcheinander gestellt. Ich konnte darauf mit vollkommener Sicherheit durch Vergleich der Indolreaktionen die Röhrchen wieder richtig auf die Gruppen verteilen.

Beruht nun die für die 2 ersten Gruppen charakteristische schwache Indolbildung auf einem langsamer verlaufenden Prozeß, oder darauf, daß überhaupt nur eine geringere Indolmenge als bei den starken Indolbildnern abgespalten werden kann? Um die Frage zu klären, wurden die 3 Stämme A, R und **I** 33 je in 10 Röhrchen ausgesät und dann zu verschiedenen Zeitpunkten ein Röhrchen von jedem der 3 Stämme in den Eiskeller gestellt. Endlich wurde mit allen 30 Röhrchen gleichzeitig die Indolreaktion angestellt und die Stärke der Reaktion schätzungsweise durch eine Zahl angegeben: 0 = keine Reaktion, 1 = die schwächste, gerade noch völlig sicher erkennbare Reaktion, 2 = eine Reaktion, die eben mit völliger Sicherheit als stärker als „1" beurteilt werden konnte usw. Wenn 2 Reaktionen mit der gleichen Zahl bezeichnet sind, bedeutet das also, daß zwischen beiden kein Unterschied beobachtet werden konnte. Die stärkste Reaktion wurde willkürlich als 10 bezeichnet. Es ergaben sich dann die folgenden Beziehungen zwischen der Bebrütungszeit und der Stärke der Reaktion bei den verschiedenen Stämmen.

	4	7	13	25	33	50	75	97	130	173 Std.
Stamm A	0	0	0,5	1	1	1,5	2	2	2	2
„ R	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
„ **I** 33	0	2	8	9	10	10	10	10	10	10

Man sieht also, daß die Tryptophanspaltung bei den schwachen Indolbildnern nur bis zu einem bestimmten Punkt fortschreitet und

1) Die übrigen Gläser schieden aus, weil sie durch besondere Länge der betreffenden Röhrchen ohnehin erkennbar waren.

dann aufhört (vorausgesetzt, daß das gebildete Indol nicht weiter verbraucht wird; in diesem Falle muß man annehmen, daß sich ein Gleichgewichtszustand zwischen 2 entgegengerichteten Prozessen einstellte).

Wie ersichtlich, bietet das Verhalten eines Stammes bei der Indolprobe größere Möglichkeiten für seine spezielle Charakterisierung, als man von vornherein vermuten konnte, denn man kann die Stämme nicht nur in indolpositive und indolnegative scheiden, sondern muß innerhalb der indolpositiven zwischen schwachen und starken Indolbildnern (das letztere ist das Gewöhnlichere), ja sogar zwischen mehreren verschiedenen Graden von schwacher Indolreaktion unterscheiden.

Die oben beschriebenen Indolversuche sind darum zuerst erwähnt, weil sie ein besonders klares Bild über das Verhalten dieser Reaktion geben, aber schon früher wurden die verschiedenen Stämme und Subkulturen mehrmals mit der Indolreaktion untersucht und immer mit übereinstimmendem Ergebnis. Von besonderem Interesse ist es, daß alle die auf S. 106 erwähnten 60, für Agglutinationsprüfung verwandten Kulturen gleichzeitig auch auf Indolbildung untersucht wurden. Ohne Ausnahme gaben sie alle ganz dieselbe schwache Indolreaktion. Auch bei einer Reaktion, die kurz, nachdem ich die Kulturen bekommen hatte, angestellt wurde, gaben die 3 Kulturen alle, soweit ein Vergleich nach dem Gedächtnis möglich ist, eine ganz ähnliche schwache Reaktion, jedenfalls eine viel schwächere, als die, die bei dem gleichzeitig untersuchten Stamm Sch. gefunden wurde.

Das Indolbildungsvermögen ist also trotz agglutinatorischer Veränderungen das gleiche geblieben. Dieses gleichförmige Verhalten der Indolreaktion ist in 2 Beziehungen interessant. Es kann einerseits als Wahrscheinlichkeitsbeweis dafür dienen, daß die agglutinatorischen Variationen nicht auf Verunreinigungen beruhen, denn in diesem Falle sollten die ursprünglichen Kulturen aus einer Mischung von mehreren Kulturen bestanden haben mit ganz demselben, nicht häufig vorkommenden Grad von Indolbildungsvermögen. Andererseits sieht man, wie eine Eigenschaft stark variieren kann, ohne daß dieses irgendwelchen Einfluß auf eine andere Eigenschaft hat.

Zusammenfassung.

Bei einem Falle von Pfeiffer-Bazillenmeningitis erwiesen sich der Spinalstamm und der Rachenstamm agglutinatorisch identisch. Bei einem andern Falle erwiesen sich der Spinalstamm und der Rachenstamm des Kranken und der Rachenstamm der Mutter als agglutinatorisch identisch, wenn die Untersuchung nicht zu lange nach der Isolierung vorgenommen wurde. Später änderte der Spinalstamm seine agglutinatorischen Eigenschaften. Die Indolreaktion der verschiedenen Stämme aber blieb vollständig unverändert. In einem 3. Falle erwiesen sich der Spinalstamm und der Blutstamm als identisch sowohl bei der Agglutination als auch bei der Indolprobe.

Man kann also bei dem Pfeifferschen Bazillus — wie wohl überall in der Bakterienwelt — Variationen treffen. Im ganzen ist jedoch die Konstanz der Eigenschaften so stark ausgeprägt, daß die große Inhomogenität innerhalb dieser Bakterienart ein starkes Argument

gegen die Annahme ist, daß er als spezifisches Influenzavirus anzusprechen sei.

Literatur.

Anderson u. Schulz, Journ. of experim. Med. Vol. 33. 1921. p. 653. — Bieling, Zeitschr. f. Immunitätsf. Bd .29. 1920. S. 475. — Bieling u. Joseph, ibid. Bd. 29. S. 228. — Cecil and Steffen, Journ. of inf. Dis. Vol. 28. 1921. p. 201. — Christiansen u. Kristensen, Acta med. Scand. T. 55. 1921. p. 297. — Kristensen, Investigations into the Occurrence and Classification of the haemoglobinophilic Bacteria. Kopenhagen 1922. — Lemm, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 90. 1923. S. 414. — Maitland and Cameron, Brit. Journ. of experim. Pathol. Vol. 2. 1923. p. 283. — Park and Cooper, Journ. of Immunol. Vol. 6. 1921. p. 81. — Park, Williams and Cooper, Proceed. Soc. for experim. Biol. a. Med. Vol. 16. 1918. p. 120. — Povitzky and Denny, Journ. of Immunol. Vol. 6. 1921. p. 65. — Rivers, John Hopkins Hosp. Bull. Vol. 30. 1919. p. 129. — Rivers and Kohn, Journ. of experim. Med. Vol. 34. 1921. p. 477. — Schmidt u. Weinberg, Klin. Woch. 1924. S. 66. — Schneider, Arch. f. Hyg. Bd. 93. S. 26. — Seligmann u. Wolff, Berl. klin. Woch. 1920. S. 677 u. 709. — Skajaa, Om Influenza og Influenzapneumoni. Bergen 1921. — Stillman and Bourn, Journ. of experim. Med. Vol. 32. 1920. p. 665. — Valentine and Cooper, Journ. of Immunol. Vol. 4. 1919. p. 359. — Die Arbeit von Lubinski, Ztschr. f. Hyg. Bd. 103. 1924. S. 298, erschien nach Einlieferung dieser Mitteilung und konnte somit nicht berücksichtigt werden.

Zur Aetiologie der Masern.

Zweite Mitteilung[1]).

Von Oberstabsarzt Dr. **Donges**, Rostock i. Mecklenburg.
Divisions-Sanitätsabteilung 2.

Meine Absicht, vor Veröffentlichung dieser 2. Mitteilung, die Ende April 1923 wegen Erlöschens der Masernerkrankungen in Rostock zum vorläufigen Abschluß gekommenen Masern-Untersuchungen fortzusetzen und weitere und neue Untersuchungsresultate zu sammeln, hat sich leider bisher nicht verwirklichen lassen.

In der Zwischenzeit bis jetzt sind in Rostock neue Erkrankungsfälle an Masern trotz eifriger Nachforschung mir nicht zur Kenntnis gekommen, bzw. standen mir für Untersuchungszwecke nicht zur Verfügung.

In Ergänzung der vorläufigen Mitteilung möchte ich im folgenden die Protokolle der vorjährigen Untersuchungen mitteilen und einige Schlußfolgerungen daran anknüpfen.

Die Untersuchungen erstreckten sich auf 21 Masernfälle, bei denen — abgesehen von 3 negativ verlaufenen Untersuchungen[2]) — in 14 Fällen aus dem Blut, 1 Fall aus Blut und Hautschüppchen, 3 Fällen aus Schüppchen von mir Streptokokken gefunden und gezüchtet wurden,

---

1) Vorläufige Mitteilung: Ueber Streptokokkenfunde und Streptokokkenzüchtung aus dem Blute von Masernkranken. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 91. 1923. Heft 1. S. 45.)

2) S. vorl. Mitteilung; die Blutabnahme war in diesen 3 Fällen nicht von mir ausgeführt; der Transport von der Blutabnahme und der Beimpfung der Grugelchen Mucinbouillon bis zum Brutschrank dauerte 4 bzw. 20 Std

die aus Diplokokken zusammengesetzt, in der 1. Generation außerhalb des Körpers im mikroskopischen Präparat die morphologischen Formen des Streptococcus longissimus und conglomeratus aufwiesen; biologisch war in allen Fällen auf Schottmüllerschem Blutagar eine starke hämolytische Eigenschaft festzustellen gewesen; der Vollständigkeit halber erwähne ich, daß bei der in einem Falle aus dem Mandelabstrich reingezüchteten Streptokokkenkultur keine hämolytische Eigenschaft zu beobachten war.

In der Tabelle sind die Resultate der vorjährigen Untersuchungen zusammen-

Masernfall	Material	Name	Alter	Exanthembeginn	I. Abnahme			II. Abnahme		
					Datum	G. M. B.	T. B.	Datum	G. M. B.	T. B.
1	Blut	Gr., Carola	8 Jahre	11. 3. 23	13. 3. 23	+	—	21. 3. 23	—	—
2	„	Re., Sabine	3 „	15. 3. 23	16. 3. 23	+	—	21. 3. 23	+	—
3	„	Ra., Paul	31 „	15. 3. 23	16. 3. 23	+	—	21. 3. 23	+	—
4	„	Gö., Friedrich	2 „	20. 3. 23	21. 3. 23	+	—	6. 4. 23	+	+
5	„	Fr., Hans	4½ „	19. 3. 23	21. 3. 23	+	—	31. 3. 23	+	+
6	„	Zi., Werner	3 „	20. 3. 23	21. 3. 23	+	—	.	.	.
7	„	Me., Gertrud	8 „	20. 3. 23	21. 3. 23	+	—	.	.	.
8	„	La., Rudolf	2 „	23. 3. 23	24. 3. 23	+	—	4. 4. 23	+	+
9	„	La., Irma	2 „	24. 3. 23	24. 3. 23	+	—	4. 4. 23	+	+
10	„	Wu., Heinrich	3 „	23. 3. 23	24. 3. 23	+	—	.	.	.
11	„	Re., Brigitte	1 „	25. 3. 23	26. 3. 23	+	—	4. 4. 23	—	—
12	„	Bo., Anna	26 „	31. 3. 23	2. 4. 23	+	—	7. 4. 23	+	—
13	„	Bo., Paula	5 Wochen	6. 4. 23	7. 4. 23	+	—	11. 4. 23	+	+
14	„	Schl., Maria	½ Jahr	10. 4. 23	11. 4. 23	+	—	13. 4. 23	+	+
15	„	Schü., Margarete	½ „	12. 4. 23	13. 4. 23	+	—	.	.	.
3	Schüppchen	Ra., Paul	31 Jahre	15. 3. 23	21. 3. 23	+	+	.	.	.
16	Schüppchen	Ha., Lena	¾ „	11. 3. 23	21. 3. 23	+	+	.	.	.
17	Schüppchen	La., Bertha	¾ „	9. 3. 23	21. 3. 23	+	+	.	.	.
18	Schüppchen	Schr., Fritz	½ „	11. 3. 23	21. 3. 23	+	+	.	.	.
12	Mandelabstrich	Bo., Anna	26 „	31. 3. 23	7. 4. 23	+	+	.	.	.

G. M. B. bedeutet Grugelsche Mucinbouillon;
T. B. „ Traubenzuckerbouillon;

Experimentelle Weiterzüchtungen der Streptokokken durch Einschalten von Tierpassagen usw. konnten aus Mangel an Tieren nicht durchgeführt werden; diese müssen noch nachgeholt werden.

Auf den künstlichen flüssigen und festen Nährböden gingen die lange Wachstumsform und die hämolytische Eigenschaft der Masernstreptokokken allmählich verloren.

Ueber die angestellten Untersuchungen der Agglutination, der Präzipitation, der Komplementbindung und die bakteriziden Versuche mit normalem und Patientenserum soll nach Abschluß weiterer Untersuchungen in einer späteren Mitteilung berichtet werden.

Als Blutabnahmestelle wurde das Ohrläppchen oder die Fingerbeere gewählt oder beide gleichzeitig, nach gründlicher Desinfektion (Alkohol und Aether) der Entnahmestelle und Umgebung; es wurde mit einer gut ausgeglühten Nadel oder Lanzette ein kleiner Einstich gemacht und die auf Druck hervorquellenden dicken Blutstropfen in den Nährboden — die Grugelsche Mucinbouillon — fallen lassen, ohne

den Rand des Nährbodenkölbchens zu berühren; es gelang, Reinkulturen der Streptokokken in der I. Generation zu erhalten.

In meinen Untersuchungen erwies sich mit der Blutmenge von 1—2 dicken Blutstropfen der Tag des Exanthemausbruches und der 1. oder 2. Tag nachher als geeigneter Zeitpunkt der Blutabnahme; ob auch schon früher im Inkubationsstadium oder vor dem Exanthembeginn die Züchtung der Streptokokken unter Umständen durch Verwendung größerer Blutmengen gelingt, müssen weitere Untersuchungen ergeben.

gestellt.

III. Abnahme			
Datum	G. M. B.	T. B.	Bemerkungen
.	.	.	leichter Krankheitsverlauf;
25. 3. 23	—	—	leichter Krankheitsverlauf;
25. 3. 23	—	—	„ „
.	.	.	langsame Genesung; 8. 4. 23 entlassen und abgereist;
.	.	.	„ „ 1. 4. 23 „ „ „
.	.	.	gestorben 25. 3. 23;
.	.	.	leichter Krankheitsverlauf;
21. 4. 23	+	+	langsame Genesung; Otitis; 24. 4. 23 entlassen und abgereist;
.	.	.	langsame Genesung; 6. 4. 23 entlassen und abgereist;
.	.	.	gestorben 26. 3. 23;
.	.	.	leichter Verlauf;
11. 4. 23	—	—	leichter Verlauf; Mutter }
.	.	.	gestorben 13. 4. 23; Kind }
21. 4. 23	+	+	langsame Genesung; 24. 4. 23 entlassen und abgereist;
.	.	.	gestorben 21. 4. 23;
.	.	.	} ohne Komplikation verlaufene Masernfälle, Blutabnahme leider nicht möglich gewesen.
.	.	.	
.	.	.	
.	.	.	
.	.	.	

\+ bedeutet Wachstum bzw. Züchtung;
— „ keine Züchtung;

An welchem Tage des Inkubationsstadiums bei den Masern die Streptokokken von der Schleimhaut der Atmungswege in das Blut eindringen und ihre schädigende Wirkung beginnen, läßt sich nur schätzungsweise annehmen; bis zum Auftreten des Exanthems werden im allgemeinen 14 Tage angenommen; da meist katarrhalische Erscheinungen, Bronchitis vorangehen, so wird hierdurch eine Auflockerung der Lymphspalten des Rachens, der Mandeln, Lungengewebes erfolgen.

In 5 meiner Fälle waren nach 10 Tagen nach Exanthemausbruch die Streptokokken nicht mehr gefunden worden; in diesen Fällen handelte es sich um normalen Masernverlauf ohne Komplikationen und ohne Sekundärerkrankungen; die Patienten 1, 2 und 11 waren Kinder zwischen 1 und 8 Jahren, von gutem Ernährungszustand, guter körper-

licher Beschaffenheit und aus sozial verhältnismäßig gutgestellten Familien (Offiziers-, Arztkinder). die Patienten 3 und 12 waren Erwachsene (Unteroffizier, Schnitterin); bei Fall 7 (Beamtentochter) war leider eine 2. Blutabnahme nicht möglich.

In 4 anderen Fällen (4, 5, 9, 14) wurden die Streptokokken noch nach 10—16 Tagen gefunden, in Fall 8 noch nach 28 Tagen; hier handelte es sich um uneheliche Kinder mit leidlicher Körperkonstitution; die Genesung ging langsam vor sich (zeitweise Temperatursteigerungen über 38° C, Otitis); in allen Fällen Heilung, auch bei Patient 8 und 14.

In 4 Fällen (6, 10, 13, 15) trat Exitus ein (Pneumonie); es waren uneheliche Kinder in elendem Zustande.

Leider konnten aus äußeren Gründen die Fälle 4, 5, 7, 8, 9, 14 nicht, wie es wichtig und wünschhenswert gewesen wäre, weiter untersucht werden.

Die Hauptübertragungsgelegenheit für die Weiterverbreitung der Masern ist die Tröpfcheninfektion, ferner die Kontaktinfektion (Schüppchen, Wäsche, Gebrauchsgegenstände); demnach müssen die Vorbeugungs- und Quarantänemaßnahmen einsetzen, wo die Streptokokken zur Ausscheidung gelangen: Isolierung, Schutz vor der Tröpfcheninfektion und der Kontaktinfektion, Gurgeln und Pinseln des Rachens mit Desinfizientien, Desinfektion der gebrauchten Wäsche, der Gebrauchsgegenstände, Desinfektion des gesamten Luftraumes und sämtlicher Gegenstände des Krankenzimmers.

Anzunehmen ist nach Analogie mit anderen Infektionskrankheiten, daß nach Ueberstehen der Masern noch lange Zeit in den Tonsillen und auf den Schleimhäuten der Atmungsorgane von Masernrekonvaleszenten die Masernstreptokokken vegetieren und Anlaß zu sporadischen und sonst schwer zu erklärenden Neuinfektionen abgeben können, besonders bei Kindern, bei denen die Streptokokken lange im Blute persistieren (Masernstreptokokkenträger).

Außerdem muß angenommen werden, daß die Streptokokken die Eigenschaft besitzen müssen, nach dem Ausscheiden aus dem Körper (Schleimhaut, Schüppchen) eine Art Dauer- oder Kapelstadium anzutreten, aus dem sie erst wieder beim Auftreffen, Hineingelangen und bei der Uebertragung auf menschliche Schleimhäute auskeimen. Durch Versuche ist festgestellt, daß Streptokokken längere Zeit in lufttrockenem Zustande lebensfähig bleiben können; z. B. bewahrt der Streptococcus des Erysipels, auf Seidenfäden angetrocknet und konserviert, noch nach 52 Tagen seine Lebensfähigkeit; es ist durch verschiedene Untersuchungen bestätigt, daß die Streptokokken bereits im gesunden Körperzustand in der Mund- und Rachenhöhle vorhanden sind; im Mundschleim usw. siedeln sie sich mit Vorliebe an, besonders bei fieberhaft erkrankten Personen; die Oberfläche der Mandeln stellt eine Stätte des üppigsten Wachstums der Streptokokken dar; woher jedesmal die Streptokokken in der Mundhöhle usw. kommen, diese Frage muß unentschieden bleiben.

Zu prophylaktischen Impfungen wurden aus den Reinkulturen der Masernstreptokokken mono- und polyvalente Vakzinen hergestellt (24-stünd. Glyzerinagarkulturen bei 37° C gezüchtet, Abschwemmung mit physiol. Kochsalzlösung, Abtötung im Wasserbade bei 57° C). Mit Er-

laubnis der Herren Direktoren wurde in der Universitäts-Kinderklinik bzw. in dem angeschlossenen städtischen Säuglingsheim und der Medizinischen Klinik von den Herren Stationsärzten, die Masernfälle in Behandlung hatten, und denen ich diese Vakzinen zur Verfügung gestellt hatte, nach meiner Anweisung im Abstand von 2 Tagen injiziert, als Dosis bei Säuglingen und Kindern unter 4 Jahren 20 Millionen Keime in 0,5 ccm, bei Kindern über 4 Jahre 40 Millionen Keime in 1,0 ccm; 2—3malige Injektion.

Trotzdem mir ein günstiges Urteil (schnelleres Verschwinden des Exanthems bei Masernkranken, kein weiterer Masernfall bei den prophylaktisch geimpften Kindern) über die Wirkung der Vakzinen mitgeteilt wurde, halte ich die seitherige verhältnismäßig kleine Zahl der behandelten Fälle (8) und die der prophylaktisch geimpften Kinder (16), ferner die Beobachtungszeit für noch zu gering, um eine Beurteilung der Wirkung der Vakzinen zu gestatten.

Die Fragen sind noch zu klären, ob mono- oder polyvalente Vakzinen oder Autovakzinen vorzuziehen sind, wieviel Dosen zu geben sind, wie starke Dosen, wann und in welchen Intervallen.

Um ein endgültiges Urteil über die Anwendungsweise abgeben zu können, müssen weitere Untersuchungen und Nachprüfungen an größeren Material angestellt werden. Bei der aktiven Immunisierung mit Streptokokkenvakzinen sind noch viele Fragen umstritten, ob bei dem variablen Verhalten der Streptokokken in bezug auf biologische Eigenschaften die Abtötung der Impfstoffkulturen geeignet ist und genügt, um einen nennenswerten Immunisierungserfolg zu erzielen; ob nicht zur Vermeidung von Antigenalteration eine schonende Abschwächung vorteilhafter ist; ob nicht die verschiedenen an das Lebendsein der Streptokokken gebundenen biochemischen Substanzen, die die Verschiedenheit der Krankheitsbilder der Streptokokkenerkrankungen verursachen, als Antigenunterschiede wichtig sind, so daß wir zur Erzielung eines guten Immunzustandes nach geeigneter Vorbehandlung mit abgetöteten und abgeschwächten schließlich lebende Streptokokkenkulturen als Antigen verwenden müßten. Bei unserer Unkenntnis über die Ursachen der Zustandsänderungen der Streptokokken, deren Virulenz, bleibt für den Menschen — selbst wenn es im Tierversuch gelingt — die Anwendung lebender Streptokokkenkulturen, die zur Erhaltung der biologischen Eigenschaften und der biochemischen Komponenten möglichst frisch aus dem Blute gezüchtet sein müssen, zu Immunisierungszwecken ein Problem.

Für die Zwecke der Therapie ist nach meiner Ansicht eine Verbindung von Vakzine mit Rekonvaleszentenserum vorteilhaft (Simultanimpfung), ob die Verabreichung eines Masernstreptokokkenserums zu prophylaktischen oder Heilzwecken Erfolg haben wird, erscheint nach den Erfahrungen mit den sonst gebräuchlichen Streptokokkensera fraglich. Die bei Erysipel anscheinend mit günstigem Erfolg angestellten Versuche mit der Reizvakzinetherapie (Strepto-Yatren) — einer Kombination einer aktiv immunisierenden spezifischen Vakzine mit unspezifischem Reizstoff — bieten vielleicht auch bei den Masern therapeutische Erfolge.

Das Rekonvaleszentenserum wird am besten zu entnehmen sein zu der Zeit, wo viele Immunkörper im Blute vorhanden sind, also nachdem

viele Streptokokken im Blute gekreist und die Antikörperprodukte intensiv angeregt haben, im allgemeinen anscheinend in den ersten Tagen nach dem Exanthembeginn.

Von den Tierversuchen (3 Meerschweinchen, 7 Mäuse) verlief ein Mausversuch nach 48 Std. tödlich, die übrigen Versuchstiere überstanden ohne jegliche klinische Erscheinungen die experimentelle Infektion; die Tiere wurden nach 9—10 Tagen getötet. Pathologisch-anatomisch (Pathologisches Universitätsinstitut Rostock) wurde ein auffallender Befund nicht erhoben; in den Blutausstrichen keine Abweichung vom normalen Blutbild, in den Nierenglomeruli keine Kokkenembolien auch sonst in den untersuchten Organen weder Eiterungen noch Streptokokken in den Blutgefäßen nachweisbar.

Die Tierversuche waren in der üblichen Weise mit intraperitonealer Injektion 24stünd. Reinkulturaufschwemmung lebender Streptokokken in physiol. Kochsalzlösung angestellt. Vielleicht sind experimentelle Tierversuche aussichtsreicher, die mehr dem natürlichen Infektionsmodus — soweit technisch möglich — ähnlich gemacht werden; statt der intraperitonealen Injektion Bestreichen (Einblasen) der Atmungswege mit frisch aus dem Blute gezüchteten Reinkulturen der Masernstreptokokken oder mit Schleim vermengter Masernstreptokokken, oder um einen Schritt weiter zu gehen, mit unmittelbarer intravenöser Uebertragung von im richtigen Zeitpunkt entnommenen streptokokkenhaltigen Blutes von Masernpatient auf Versuchstier (Mensch?) mit Ausschaltung jeglicher alterierenden Behandlung des Blutes.

Die Masernstreptokokken scheinen nach dem Ausfall der Tierversuche im allgemeinen von geringer Virulenz zu sein, da mit einer einzigen Ausnahme die gegen Streptokokken außergewöhnlich empfindlichen Mäuse sämtlich die experimentelle Infektion überstanden; auch der in der Mehrzahl der Masernerkrankungsfälle leichte und komplikationslose Verlauf der Masern spricht dafür; das Hinzutreten von Sekundärkrankheiten bei Masern geht meistens mit schlechter Körperkonstitution einher.

Die Masern sind nach meiner Ansicht eine mit Exanthem verlaufende Streptokokkenerkrankung, für deren ursächliche Erreger ich die von mir beschriebenen Streptokokken halte; diese stellen keine besondere Streptokokkenart, sondern einen besonderen Streptokokkenzustand dar, deren wichtigste zurzeit nachweisbaren Zustandsformen das außergewöhnlich lange Wachstum und die starke hämolytische Komponente sind. Aus welchen Gründen ich diese Streptokokken mit den Masern in ätiologische Beziehung bringe, darüber habe ich in der vorläufigen Mitteilung die entsprechenden Ausführungen gemacht (vgl. diese), daß dieselben in allen 15 Fällen aus Blut, in 3 Fällen aus den Schüppchen und 1 Fall aus Blut und Schüppchen (1 Fall aus dem Mandelabstrich) gefunden und gezüchtet wurden; bei der experimentellen Krankheitserzeugung im Tierversuche führen vielleicht Verbesserungen der Versuchsanordnung zu positiven Resultaten, vorausgesetzt, daß unsere behaarten Versuchstiere überhaupt für Masern empfänglich sind. Immer ist zu bedenken, daß bei der natürlichen Infektion noch andere Momente (Disposition usw.) mitsprechen; auch mit den Erysipelstreptokokken gelingt es nicht immer, experimentell Erysipel zu erzeugen.

Bei aller Skepsis scheint — soweit eine verhältnismäßig kleine Untersuchungszahl beweiskräftig ist — die Annahme nicht unberechtigt, daß es sich nicht um ein Begleitbakterium oder Mischinfektionserreger,

sondern um den ursächlichen Masernerreger handelt; kein klinischer oder pathologisch-anatomischer Befund spricht dagegen.

Was die hämolytische Eigenschaft anbetrifft, so besitzen, von der Annahme ausgegangen, daß die auf künstlichen Nährböden nachweisbaren Eigenschaften der Bakterien auch während ihres Aufenthaltes im Körper vorhanden sind, einige Zeit nach dem Verlassen des Körpers (Blutes) noch anhaften und erst allmählich verloren gehen, die aus dem Blute gezüchteten Masernstreptokokken eine starke hämolytische Komponente; es besteht aber auch die Möglichkeit, daß bei der Empfindlichkeit der Streptokokken bereits mit dem Austritt aus dem Blut eine Zustandsänderung von biologischen Eigenschaften eintreten kann (Tierversuche); ja sogar im lebenden Blute müssen Zustandsänderungen angenommen werden; ebenso wie solche stattfinden können beim Uebertritt und Eindringen von der Körperoberfläche (Schleimhäute) in das Blut (z. B. Erwerben der hämolytischen Eigenschaft) und beobachtet werden beim Weiterzüchten auf verschiedenen Nährböden. Die auslösenden Ursachen dieser Zustandsänderungen sind uns unbekannt; von Einfluß scheinen Aenderungen der Lebensbedingungen zu sein.

Daß die Stärke der hämolytischen Komponente nicht identisch ist mit Virulenz und schwerer Krankheitsform, dafür sprechen, abgesehen von den Tierversuchen, die Masernfälle 10, 13, 15, wo Exitus eintrat und die hämolytische Eigenschaft bereits in der 3. Generation umgeschlagen (Viridans) bzw. verloren gegangen war, während sie im Falle 1 bei einem normal und leicht verlaufenen Masernfalle bis in die 6. Generation (nach 6 Wochen) vorhanden war.

Was die Frage anbetrifft, ob die Masernstreptokokken bzw. deren Toxine am Zustandekommen des Exanthems ursächlich beteiligt sind, so ist vielleicht das Exanthem als eine Reaktion auf Stoffe aufzufassen, die von den Masernstreptokokken im Verlaufe der Infektion gebildet werden (Sensibilisation) — bei vielen Sepsisfällen werden Exantheme beobachtet —; diese Stoffe (bakterieller oder toxischer Art) können die anaphylaktischen Erscheinungen wie ein artfremdes Eiweiß hervorrufen (Seruminjektion, Genuß mancher Nahrungsmittel — Krebse, Erdbeeren usw. — und mancher Medikamente — Antipyrinpräparate, Chinin —). Wie sich diese Stoffwechselerkrankungen abspielen, ist bisher nicht bekannt und wird vielleicht unbekannt bleiben.

Mitteilen möchte ich, daß in einem Falle von Röteln ebenfalls die Züchtung hämolytischer Streptokokken vom Typus der Masernstreptokokken aus dem Blute des Patienten gelang; leider ist es bisher der einzige Fall geblieben, den ich zu untersuchen Gelegenheit hatte.

Außer für die Masernuntersuchungen wurde die Grugelsche Mucinbouillon in einigen anderen Erkrankungsfällen in der Medizinischen Universitätsklinik Rostock angewandt: Endocarditis lenta, chronische Sepsis, chronischer Gelenkrheumatismus, infektiöse Cholangie, perniziöse Leukämie, lymphatische Leukämie; in einem Falle von Endocarditis lenta, bei dem es bereits über 8mal vergeblich mit anderen Nährböden versucht worden war, gelang es bei der 1. Beimpfung der Grugelschen Mucinbouillon — neben Sekundärverunreinigungen von Hautmikroorganismen — Streptokokken vom Typus des Viridans zu züchten; es wurde eine Reinkultur und daraus eine Autovakzine hergestellt; der hiermit behandelte Patient wurde nach Mitteilung des behandelnden Herrn Stationsarztes nach etwa 4 Wochen als geheilt ent-

lassen; im Falle einer chronischen Sepsis führte die 1. Blutentnahme und Beimpfung der Grugelschen Mucinbouillon ebenfalls zur Züchtung von Streptokokken vom Typus des Viridans; es wurde eine Reinkultur, daraus eine Autovakzine hergestellt, ebenfalls Heilung.

Die Grugelsche Mucinbouillon setzt sich zusammen aus:

1000,0 g bestes fettfreies Rindfleisch,

500,0 g Rinderzunge,

500,0 g Maulschleimhaut und Speicheldrüsen von einem Rind; alles feingehackt; zu den 2000,0 g kommen 3000,0 g Aqua comm.; 16 bis 20 Std. kalt stehen lassen; hierauf wird das Ganze 1 Std. bei $^1/_2$ Atm. im Autoklaven erhitzt, filtriert, die Reaktion gegen Lackmuspapier stark alkalisch gemacht ($p_H = 8^0$); dann werden 1 Proz. Pepton und $^1/_2$ Proz. Kochsalz zugesetzt und 1 Std. im Dampftopf gekocht; Filtrieren, bis vollständig klar; Abfüllen in Kölbchen von 90 ccm; jedes Kölbchen erhält schließlich einen Zusatz von 10 ccm sterilem Pferdeserum.

(Nach einem am 17. Mai 1923 in der Naturforschenden und Medizinischen Gesellschaft zu Rostock gehaltenen Vortrage.)

Allen Herren, die mich bei meinen Untersuchungen unterstützt haben, besonders den Herren Direktoren der Universitäts-Kinderklinik, der Medizinischen Klinik, des Hygienischen und des Pathologischen Instituts möchte ich für das freundliche Entgegenkommen meinen ergebensten Dank sagen.

Die Spirochäten des Primäraffekts.

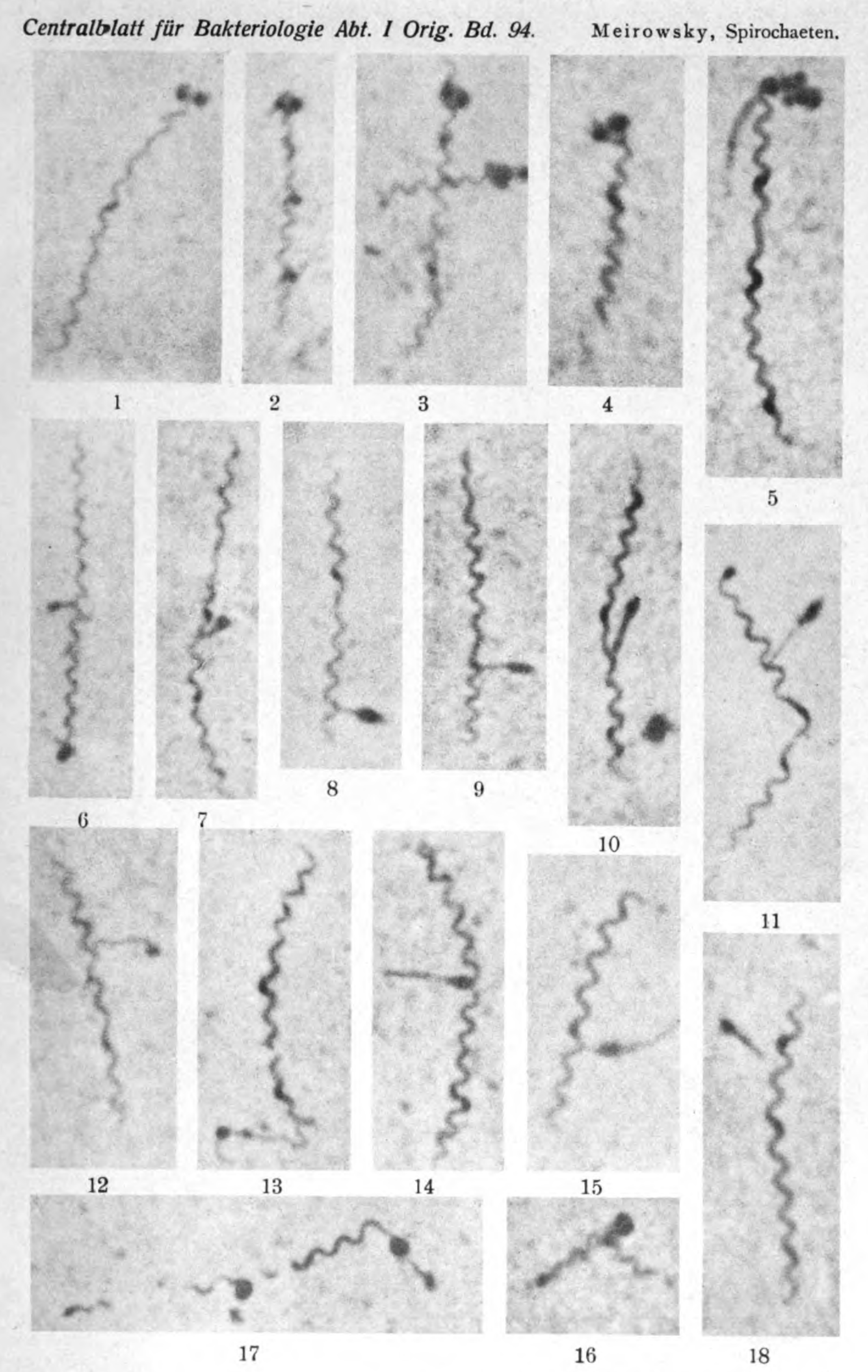
[Aus dem Privatlaboratorium von Prof. Meirowsky, Köln.]

Von Prof. **Meirowsky**, Köln.

Mit 1 Tafel.

Während man in Primäraffekten, die spärliche Spirochäten enthalten, nur ausnahmsweise alle jene Veränderungen findet, die ich vor 13 Jahren als Seiten- und Endknospen, als seiten- und endständige Dolden und als freie Knospen beschrieben habe, sind diese Gebilde in Schankern, die von Spirochäten „wimmeln", in großer Reichhaltigkeit ohne Schwierigkeit zu finden. Ich habe meine 2 Min. in Osmiumdämpfen geräucherten und mit Pappenheims Friedenspanchrom 1913 gefärbten Präparate nochmals durchgearbeitet und aus einem einzigen Präparat 150 Mikrophotogramme angefertigt, die die von mir in ihrer Gesamtheit zuerst beschriebenen Befunde so deutlich zeigen, daß die Veröffentlichung einiger Photogramme gerechtfertigt erscheint.

Fig. 1. Lange Spirochäte, die an ihrem Ende eine doppelte Endknospe trägt. Eine protoplasmatische Verbindung zwischen den beiden Knötchen ist angedeutet, in der Fig. 2 ganz deutlich ausgeprägt, ebenso in Fig. 3. Hier geht aus einer der beiden Endknospen eine deutliche Spirochätenwindung hervor. Fig. 4 zeigt die beiden Gebilde deutlich durch einen feinen Stiel getrennt, und in Fig. 5 ist das von mir als endständige Dolde bezeichnete Gebilde vorhanden. Man sieht am Ende der langen Spirochäte, die Streckung und an 3 Stellen die von mir beschriebene Win-



Lichtdruck von J. B. Obernetter, München.

Verlag von Gustav Fischer in Jena.

dungsverdickung zeigt, eine protoplasmatische Masse mit deutlicher Differenzierung einiger dunkler gefärbter Punkte; einer derselben zieht sich in einer deutlich geschwungenen bogenförmigen Linie fort. Die folgenden Figg. 6—11 zeigen gestielte Knospen in den verschiedensten Größen, die in den Figg. 12 und 13 deutlich Spirochätencharakter tragen. Figg. 14, 15, 16 zeigen, daß auch an einem seitenständigen Knötchen, solange es noch der Spirochäte anliegt, ein gerader, ein gebogener Stiel oder sogar eine echte Spirochäte sich entwickeln kann. Die Fig. 18 zeigt eine freie, noch in der Nähe der Spirochäte liegende, jedoch von ihr bereits losgelöste Spirochäte und Fig. 17 dasselbe Gebilde mit Spirochätenwindung.

Die kurze, nur 2 Min. lang dauernde Räucherung in 2proz. Osmiumdämpfen läßt jede Auflösung des Spirochätenleibes als ausgeschlossen erscheinen; denn mit dieser Fixierungsmethode erzielt man bekanntlich die beste Darstellung der Spirochätenwindungen. Es sind also sicher keine regressiven Veränderungen, die hier vorliegen, sondern progressive. Die Erbmasse der Spirochäte liegt in der Spirochätenknospe, die deshalb die Fähigkeit besitzt, zu einer neuen Spirochäte auszuwachsen, gleichgültig ob sie noch der Spirochäte anhaftet oder von ihr losgelöst ist. Neben der Querteilung ist dies der Fortpflanzungsweg der Spirochäten, den man unter besonderen Umständen auch bei der künstlichen Züchtung der Spirochäten in gleicher Weise findet.

Eine Veröffentlichung weiterer Befunde wird im Archiv für Dermatologie erfolgen.

Experimentelle Beiträge zur Frage über die Wassermannsche Reaktion.

[Aus dem Zentrallaboratorium der Kirghisenrepublik in Orenburg.]

Von Prof. Dr. L. **Horowitz-Wlassowa.**

Petersburg, z. Zt. Orenburg.

1923—24 hatten wir Gelegenheit, ca. 2000 WaR. in Orenburg anzustellen und dabei einige Untersuchungen über deren Methodik und verschiedene Modifikationen auszuführen. Die übliche Methodik war folgende: Als Antigen wurde der Alkoholrinderherzextrakt in der Verdünnung $^{1}/_{10}$ verwendet, das in der Dosis von 0,05 das Komplement an sich nicht band und mit 0,2 Luesserum die Hämolyse hemmte. Das Komplement (frisches Meerschweinchenserum), in üblicher Weise titriert, war gewöhnlich in der Dosis 0,02—0,03 gebrauchsfähig. (Wegen des wechselnden Komplementtiters des Meerschweinchenserums halten wir die vorläufige Titrierung für notwendig.) Bemerkt sei, daß die genau titrierte minimale Komplementdosis nach 1 Std. im Thermostat nicht selten teilweise zerstört wird, was wir manchmal beobachten konnten, so daß sie für die Hämolyse nicht mehr ausreicht. Um die Bedingungen des Versuchs möglichst genau zu befolgen, halten wir es für zweckmäßig, die Titrierung nach vorläufigem 1 Std. langem Aufenthalt im Thermostat auszuführen, resp. das hämolytische System in Röhrchen mit steigenden Komplementdosen erst nach 1 Std. hinzuzufügen. (Die ganze Komplementmenge bleibt unterdessen im Eisschrank.)

Für den Versuch werden 0,05 ccm des mit 0,95 versetzten Antigens mit 0,2 ccm inaktivierten, zu prüfenden Menschenserums + 0,8 physiol. Kochsalzlösung vermischt, dann wird $1^1/_2$ Komplementdosis + Kochsalzlösung (bis 1 ccm) hinzugefügt. Die Röhrchen mit 3 ccm der Mischungen kommen 1 Std. bei 35° in den Thermostat, worauf 2 ccm zu 2 ccm des hämolytischen Systems hinzugefügt werden (1 ccm 5proz. Hammelerythrozyten + 1 ccm Antihammelkaninchenserums $^1/_{200}$ mit dem hämolytischen Titer $^1/_{800}$).

Andere Antigene, die wir aus Pferde-, Kaninchen-, Vogel- (Dohle-) Herzen hergestellt haben, erwiesen sich auch als verwendbar und ergaben in parallelen Versuchen identische Resultate.

Die Prüfung verschiedeener Tierspezies in bezug auf Komplementgehalt ergab verschiedene Resultate: Im frischen Meerschweinchenserum schwankt der Komplementgehalt von 0,02—0,06 ccm; ähnlichen Komplementgehalt konnten wir auch im Herzblute der Schildkröte und des Frosches nachweisen; andere Kaltblüter dagegen, wie Fische (Carassius), sind 10—20mal an Komplement ärmer, so daß 0,1 und mehr Fischblutserum keine Komplementwirkung ausüben. Dasselbe gilt für Kaninchenserum, so daß die Arbeitsdosis von 0,1—0,4 schwankt Wird aber dieses Serum unter Berücksichtigung dieser Angaben, d. h. in entsprechenden Mengen, benutzt, so leistet es denselben Dienst wie das Meerschweinchenserum, wie wir in 50 Fällen, wo parallele Versuche mit beiden Komplementen angestellt wurden, feststellen konnten. Zieselmaus- und Vogelblut ergaben dieselben Resultate. Im Menschenserum ist der Komplementgehalt sehr wechselnd — die Minimaldosis schwankt von 0,05 (in einzelnen Fällen sogar 0,01) — bis 0,2.

Das Serum großer Haustiere erweist sich als Komplementquelle unbrauchbar — das Hammelserum übt z. B. in der Menge 1,0, das Pferdeserum sogar in der Dosis 3,0 ccm keine Komplementwirkung aus. Für unsere Versuche wurde, wie oben erwähnt, Meerschweinchenkomplement verwendet.

In jeder Versuchsserie wurden Kontrollröhrchen für jedes betreffende Serum ohne Antigen angestellt. In 150 Fällen kamen 16 Fälle der „Eigenhemmung" (resp. 10,6 Proz.) zur Beobachtung. In einigen dieser Fälle konnten wir von denselben Personen (insbesondere, wenn das Blut vor der Nahrungsaufnahme entnommen wurde) Blutserum ohne eigenhemmende Eigenschaft gewinnen, in anderen Fällen dagegen blieben sie stets unverändert. Da solche Sera bei der üblichen Methodik für die WaR. verloren sind, änderten wir die Methodik in der Weise, daß wir durch vorläufige Titrierung genau die Komplementdosis bestimmen, welche durch 0,2 des betreffenden Serums gebunden ist; für den Versuch wird diese Dosis + Arbeitsdosis von Komplement verwendet. Wird z. B. die Minimaldosis von Komplement 0,02 durch 0,2 des Serums gebunden, ebenso wie 0,03 und 0,04, während mit 0,05 ccm des Komplements die vollkommene Hämolyse stattfindet, so wird für den Versuch die letztere Dosis verwendet. Auf diese Weise konnten wir für die Mehrzahl eigenhemmender Sera die WaR. anstellen und uns überzeugen, daß die Resultate immer im Einklange mit den klinischen Angaben standen. Nur ganz ausnahmsweise (in 0,1 Proz.) kamen Fälle vor, wo die Eigenhemmung auffallend ausgeprägt war (0,2 des Serums vermochten die 8fache Komplementdosis zu binden), so daß es praktisch unmöglich war, die WaR anzustellen.

Um den Komplementgehalt des Meerschweinchenserums zu erhöhen,

haben wir auf Grund der Angaben von Malkine (1), einige Versuche mit der parenteralen Einführung der Proteine angestellt.

Es erwies sich in der Tat, daß der Komplementgehalt 5—7—10 Tage nach der Einspritzung steigt, um dann wieder herabzusinken, wie aus nachstehendem Protokolle ersichtlich ist:

21. VIII.	0,6 der sterilen Milch intraperitoneal	
22. VIII.	Komplementtiter 0,02	(0,01 Hämolyse ±)
24. VIII.	„ 0,02	(0,01 ±)
29. VIII.	„ 0,008	(0,007 ±; 0,006 —)
31. VIII.	„ 0,006	(0,005 ±)
5. IX.	„ 0,02	(0,01 ±; 0,005 —)
12. IX.	„ 0,02	(0,01 ±; 0,005 —).

Am 10. Tage also ist der Komplementgehalt 3mal höher geworden.

II.

Neben der üblichen Methodik haben wir einige Modifikationen, namentlich die, welche Komplement und natürliche Hämolysine des betreffenden Menschenserums benutzen (wie Modifikationen von Stern (2), Bauer (3. u. 4), Hecht (5) nachgeprüft. Die Prüfung der Sera in bezug auf Hammelhämolysine ergab recht ermutigende Resultate: unter 59 Menschenseris enthielten 52 in der Dosis 0,2, die gewöhnlich im Wa-Versuche verwendet wird, genügende Mengen von Hämolysinen (17 wurden am Tage der Blutentnahme oder nach 24 Std. geprüft, 26 nach 48 Std. und 16 nach 3 Tagen), nur in 7 Fällen erwies sich sogar die Dosis 0,3 (2 Tage nach der Blutentnahme) als ungenügend. Die niedrigste Arbeitsdosis (für Sera, die 1—3 Tage im Eisschranke aufbewahrt waren), schwankte von 0,1—0,2 und fiel nur in seltenen Fällen (4 unter 43) bis zu 0,05.

Aus diesen Angaben geht hervor, daß die nötige Menge von Hämolysinen in der großen Mehrzahl der betreffenden Menschensera vorhanden ist, so daß die Verwendung des speziellen hämolytischen Serums tatsächlich, wie Bauer annimmt, entbehrlich ist. Es liegt der Gedanke nahe, daß die Hinzufügung der künstlichen Hämolysine des Kaninchenserums einen gewissen Ueberschuß an Hämolysinen bringt, der unter gewissen Umständen (namentlich in den Fällen, wo der Luesambozeptor im Serum nur in kleineren Mengen vorhanden ist) das Komplement dem Luessystem zu entreißen vermag, d. h. die mehr oder weniger ausgeprägte Hämolyse sogar mit den Luesseris bewirkt. Um diese Frage aufzuklären, stellten wir in 54 Fällen parallele Versuche nach der üblichen Methodik und nach der Methodik von Bauer an (selbstverständlich war in allen Fällen das Vorhandensein der natürlichen Hammelhämolysine in 0,2 ccm der betreffenden Menschensera sichergestellt).

Die vorliegende Tabelle gibt die Zusammenfassung dieser Angaben:

WaR	Brauersche Modifikation	Zahl der geprüften Sera
+++	+++	7
++	++	1
+	+	6
±	±	6
—	—	10
—	+	13
—	++	1
+	+++	4
++	+++	3
—	±	3.

Aus dieser Tabelle geht hervor, daß beide Reaktionen nur in 30 Fällen (resp. nur in 54,6 Proz.) übereinstimmend ausfallen, in den übrigen 24 Fällen dagegen die Hämolyse bei der üblichen Methodik tatsächlich stärker ausgeprägt ist, so daß die Resultate nach der Bauerschen Modifikation eine gewisse Verschiebung in der Richtung der stärkeren Hämolysehemmung erleiden. Es muß hier hervorgehoben werden, daß der Ausfall der Reaktion nach der Bauerschen Methodik in 14 Fällen besser den anamnestischen Angaben entspricht, insoweit es sich in diesen Fällen um echte klinische Lues handelte (oder Lues zu vermuten war); in 1 Falle hatte der Pat. kurz vorher die spezifische Kur durchgemacht, in 2 war das Blut für den Versuch 3—6 Monate nach dem Primäraffekt entnommen, in 1 Falle handelte es sich um einen Knaben, der in Kontakt mit den luetischen Personen wohnte, usw.

Andererseits läßt sich der Beweis der Rolle, die der Ueberschuß an Hämolysinen zu spielen vermag, durch den direkten Versuch erbringen: wird die WaR. mit dem Luesserum, das bei der üblichen Methodik +++ ergibt, mit der mehrfachen Dosis des hämolytischen Serums angestellt (z. B. 1 ccm der Verdünnung $^1/_{50}$ anstatt $^1/_{200}$), so tritt Hämolyse ein, resp. fällt die WaR. negativ aus. Es sei hier an ähnliche Angaben von Minz (6, 7) erinnert, der in seinen Untersuchungen über die WaR. mit der Lumbalflüssigkeit deren natürliche Hämolysine vorläufig entfernte, um die oben besprochene Fehlerquelle zu vermeiden.

Auf Grund dieser Angaben neigen wir zu der Ansicht, daß die Bauersche Modifikation der WaR. zielgemäß und darum beachtenswert ist, insbesondere für Sera mit kleineren Ambozeptormengen, wo sie sich als empfindlicher im Vergleich mit der üblichen Methodik erweist; die Möglichkeit, bei deren Anwendung das hämolytische Serum zu entbehren, erhöht natürlich ihren praktischen Wert, da sie Zeit und Mühe für die Anfertigung solcher Sera spart.

Es sei noch bemerkt, daß die Bauersche Modifikation mit möglichst frischen Seris angestellt werden muß, da natürliche Hämolysine nicht selten nach 1—2 Tagen teilweise zerstört werden.

Was nun die Benutzung des Komplements der betreffenden Menschenseren anbetrifft (auf denen die Modifikationen von Stern und von Hecht beruhen), so stößt sie schon vom theoretischen Gesichtspunkte aus auf große Schwierigkeiten wegen der Unmöglichkeit, Komplement in nötiger Menge zu verwenden. Tatsächlich schwankt der Komplementgehalt der Menschensera in so weiten Grenzen, daß die übliche Serumdosis 0,2 zuweilen sich als ungenügend erweist, in anderen Fällen aber die 10fache und sogar die 20fache Dosis von Komplement enthält. Nach unseren Angaben bewirkte unter 41 am Tage der Blutentnahme geprüften Seris die Dosis 0,2 Hämolyse (mit dem hämolytischen System) in 39 Fällen; darunter war für 10 Sera diese Dosis minimal, in 29 Fällen dagegen übte die Dosis 0,1 auch die komplementierende Wirkung aus. Einige Sera dieser Kategorie zeigten diese Wirkung schon in der Dosis von 0,05 (4 Fälle), in 1 Falle schließlich erwies sich sogar 0,01 als aktiv.

Später ändern sich natürlich die Verhältnisse, am 2. Tage z. B. hatten 7 unter den 17 geprüften Seris in der Dosis 0,3, 2 sogar in der Dosis 0,4, keine komplementierende Wirkung. Bemerkt sei, daß sogar bei Eisschranktemperaturen der Komplementtiter des Blutserums sehr rasch herabsinkt, so sank er in 1 Falle, wo wir ihn alltäglich

während einer Woche bestimmten, wie folgt: ex tempore 0,01, nach 1 Tage 0,1, nach 2 0,2, nach 3 0,3, nach 4 0,4, nach 5 0,8, nach 6 Tagen 1,2. Auf Grund dieser Angaben können wir annehmen, daß die Hämolyse bei der Anwendung der Modifikationen von Stern und von Hecht in manchen Fällen wegen der mangelnden Komplementdosis ausbleiben muß, in anderen Fällen dagegen, wo das Komplement in derselben Dosis des betreffenden Menschenserums im Ueberschuß ist, sie die Hämolyse sogar mit den Luesseris bewirken kann. Tatsächlich konnten wir in einer Versuchsserie, wo wir 70 Sera gleichzeitig mittels der üblichen Methodik und der Modifikation von Hecht prüften, diese Voraussetzungen bestätigen. Die Versuchsanordnung war folgende: 0,05 von Antigen, 0,2 (oder weniger) des betreffenden, nicht inaktivierten Menschenserums, 0,8proz. NaCl bis 3 ccm in einem Röhrchen gemischt, blieben 1 Std. bei 35°, dann wurden 1,0 Hammelerythrozytenemulsion und 1,0 0,8proz. NaCl-Lösung hinzugefügt. Für 6 Sera erwies sich diese Methodik wegen des Mangels an Komplement oder an natürlichen Hämolysinen in der genannten Dosis als unanwendbar; in den übrigen 64 Fällen waren die entsprechenden Kontrollen einwandfrei. Trotzdem stand der Ausfall der Reaktion nur in 33 Fällen (resp. in 51,6 Proz.) mit dem Ausfalle nach der üblichen Methodik im Einklange; in den übrigen 31 Fällen dagegen waren die Resultate nicht übereinstimmend. Namentlich ergab in 25 Fällen die Hecht-Modifikation mehr oder weniger ausgeprägte positive Resultate, indem der Reaktionsausfall nach der üblichen Methodik bestimmt negativ war; in 5 Fällen war das positive Resultat mehr ausgeprägt (++ oder +++, anstatt + usw.); in einem einzigen Falle, wo das zu prüfende Serum auffallend reich an Komplement war, erwies sich die Hecht-Modifikation —, die übliche Methodik ergab +++, resp. erwies sich der große Ueberschuß an Komplement für beide Systeme (Lues- und hämolytisches System) als hinreichend.

Es muß hier hervorgehoben werden, daß in der großen Mehrzahl dieser 25 Fälle (welche nach der üblichen Methodik negativ, nach Hecht aber positiv ausfielen) klinische Hinweise auf Lues fehlten.

Häufige Hämolysehemmung mit den Normalseris, die ziemlich reich an Komplement sind, läßt außerdem vermuten, daß Wassermann-Antigen an und für sich das Komplement des Menschenserums bindet, so daß die übrig bleibende Dosis oft nicht mehr für die Hämolyse hinreicht.

Auf Grund dieser Angaben sind wir der Meinung, daß alle Modifikationen, die das Komplement der zu prüfenden Menschensera in der besprochenen Weise benutzen wollen, theoretisch unbegründet und praktisch unanwendbar sind.

Das Menschenkomplement kann aber in anderer Weise benutzt werden. — Es sei hier an die Untersuchungen von Mutermilch und Latapie (8) erinnert, welche das zu prüfende Menschenserum in üblicher Weise inaktivieren und anstatt des Meerschweinchenserums das nicht inaktivierte Normalmenschenserum verwenden. Auf Grund der oben besprochenen Angaben kann wohl das Menschenserum in dieser Versuchsanordnung ebensogut wie das Kaninchenserum u. a. beim Mangel an Meerschweinchen gute Dienste leisten.

Bei längerer Aufbewahrung der Menschensera zeigt sich, daß die früher WaR.-negativen Sera bei derselben Versuchsanordnung positive Resultate zu ergeben beginnen, resp. 1—2 Wochen alte Sera, wie

Kontrolle ohne Antigen zeigt, an und für sich Komplement binden. Weitere Untersuchungen in dieser Richtung zeigten, daß 1. diese antikomplementäre Wirkung mit der Zeit immer steigt (nach 7 Tagen z. B. übt die Dosis 0,2 keine Hämolysehemmung aus, nach 15 Tagen bewirkt dieselbe Dosis des Serums bei derselben Versuchsanordnung Hämolysehemmung; nach 2 Monaten ist derselbe Effekt von der Dosis 0,1 bedingt), 2. daß die antikomplementäre Wirkung sich verhält, als ob sie dem Gesetze der Multipla gehorchte — 0,2 ccm z. B. des 3 Wochen alten Serums hemmen die Wirkung der Komplementarbeitsdosis 0,03; 0,4 verhindern die Wirkung der Dosis 0,06; 0,6 ccm — 0,09; 0,8—0,12 und bei 2 ccm des alten Serums bleibt die Wirkung sogar von 0,3 ccm des Komplements (resp. der 10fachen Arbeitsdosis) aus. 0,4 ccm des alten Serums dagegen sind machtlos, die Wirkung der 3fachen Dosis des Komplements zu verhindern.

Diese antikomplementäre Wirkung läßt sich auch dann nachweisen, wenn das alte Serum nicht gleichzeitig mit dem Komplement und dem hämolytischen System vermischt, sondern später hinzugefügt wird. Tritt die Hämolyse z. B. nach 15 Min. ein, so kann die Zufügung der entsprechenden Dosis des alten Serums zur Mischung derselben Dosen des Komplements und des hämolytischen Systems sogar nach 10 Min. die Hämolyse verhindern.

Wird das alte, resp. antikomplementär wirkende Serum $^1/_2$ Std. auf 55° erwärt, so ist seine antikomplementäre Wirkung herabgemindert oder vollkommen zerstört.

Die ex tempore, resp. bald nach der Blutentnahme inaktivierten Sera können zuweilen 2—3 Wochen aufbewahrt werden, ohne die „eigenhemmende“ Eigenschaft zu erwerben.

Die merkwürdige Analogie dieser Erscheinungen mit denen, die bei der Bildung der spezifischen Antikörper zur Beobachtung kommen, liegt auf der Hand. Einige Forscher nehmen bekanntlich wohl die Möglichkeit der Bildung der Antikörper in vitro an (Smirnow, Krüger, Czaikowski, Ostromislenky u. a.), doch konnten unsere eigenen Untersuchungen (9, 10) diese Angaben nicht bestätigen. Tatsächlich scheinen weitere Untersuchungen zu beweisen, daß es sich hier, trotz der auffallenden äußerlichen Analogie, um ganz andere Vorgänge handelt. Einerseits konnten wir nicht durch Immunisierung der Kaninchen mit dem komplementreichen Serum die Bildung des Antikomplements hervorrufen. Das Kaninchen bekam in 7 Wochen intravenös 7 ccm des frischen Menschenserums (samt 5,5 ccm Menschenerythrozyten zwecks Anfertigung des hämolytischen Antimenschenserums); das gewonnene Kaninchenserum, das den hämolytischen Titer $^1/_{1000}$ hatte, übte die komplementierende Wirkung in der Dosis 0,3 aus; in bezug auf die antikomplementäre Wirkung dagegen erwies es sich vollkommen inaktiv.

Andererseits konnten wir dieselbe eigenhemmende Eigenschaft auch in den alten Seris beobachten, die in frischem Zustande recht arm an Komplement waren, oder sogar kein Komplement zu enthalten schienen, namentlich im Pferdeserum, das ex tempore sogar in der Dosis 3,0, wie oben erwähnt, keine komplementierende Wirkung ausübt und doch nach 3wöchigem Stehen in der Dosis 1,0 die Wirkung der Arbeitsdosis des Meerschweinchenkomplements hemmt.

Auf Grund dieser Angaben glauben wir, daß die oben besprochenen Erscheinungen, welche den Antikörperbildungsvorgang in vitro in

auffallenderweise vortäuschen, in der Tat durch ganz andere resp. physiko-chemische Aenderungen der Sera bedingt sind.

Höchst wahrscheinlich handelt es sich hier um Globulinniederschläge, die sich in alten Seris infolge der Zerstörung der Albumine der Sera und resp. Ausbleibens von deren Schutzkolloidwirkung bilden und das Komplement adsorbieren. Manchmal lassen sich diese Niederschläge tatsächlich sogar mit unbewaffnetem Auge beobachten; in anderen Fällen scheinen Sera ganz klar zu bleiben, wie das z. B. für Seris der Fall ist, die mit Zusatz von Glyzerin 2—3 Wochen aufbewahrt werden und nichtsdestoweniger 2—3—4 Komplementdosen binden.

Hier sei daran erinnert, daß Sera von Personen, denen Blut bald nach der Nahrungsaufnahme entnommen wird, so daß die Sera infolge der Chymusresorption trübe oder opaleszierend sind, recht häufig eigenhemmend wirken. Es liegt daher der Gedanke nahe, daß es sich hier um ähnliche Vorgänge der Komplementsadsorption handelt.

III.

Ohne hier den klinischen Wert der WaR. eingehend zu besprechen, halten wir uns für berechtigt, deren hohen diagnostischen Wert auf Grund unserer eigenen Erfahrungen (ca. 2000 Versuche) nochmals hervorzuheben. Unseres Erachtens ist die positive WaR. bei luesfreien Personen eine Seltenheit; in einzelnen (2) Fällen konnten wir die positive WaR. bei Cancer hepatis beobachten, wo irgendwelcher Hinweis auf Lues fehlte. Wahrscheinlich rufen der intensive Zerfall und die Resorption des Lebergewebes in solchen Fällen tatsächlich die Bildung der Antikörper hervor, die ähnlich (resp. identisch) denen sind, welche mit unseren, aus Leber hergestellten Wassermann-Extrakten reagieren. Manchmal hatten wir Gelegenheit, die WaR. mit Seris malaria- und tuberkulosekranker Personen und in einzelnen Fällen mit den Seris malleus- und trypanosomakranker Tiere (Pferde und Meerschweinchen) anzustellen. Die Resultate sprechen deutlich zugunsten der praktischen Spezifität der Reaktion. In 10 Fällen, wo das Blut während des akuten Malariaanfalles sicher luesfreien Personen entnommen wurde, fiel die WaR negativ aus. Was nun den möglichen Einfluß der chronischen Malaria auf den Ausfall der WaR. anbelangt, so sprechen schon die hohen (bis 50 Proz.) negativen Resultate in unserer Statistik, resp. im Lande, wo chronische Malaria in unerhört hohem Maße in der Bevölkerung verbreitet ist (in einigen Bezirken bis 40—50 Proz.), gegen solche Behauptungen (11, 12, 13).

Die Frage über die positive WaR. bei Tuberkulosekranken, die einige Autoren sogar als diagnostisches Mittel zu verwerten geneigt sind (Sanssen, 14), lassen wir zurzeit unerörtert, desgleichen die über die Besredkasche Reaktion bei Luetikern, da wir beide in einer anderen, bald druckfertig werdenden Arbeit eingehend studiert haben. Vorläufig halten wir uns für berechtigt, anzunehmen, daß die Besredkasche Reaktion bei luetischen, obgleich tuberkulosefreien Personen fast regelmäßig positiv ausfällt, wie verschiedene Forscher beobachten konnten, die WaR. dagegen bei Tuberkulosekranken, aber luesfreien Personen meistens negativ ausfällt.

Zusammenfassung.

1) Unter 10 geprüften Tierspezies ist das Meerschweinchen am komplementreichsten; einige Kaltblüter, wie Schildkröte und Frosch, ent-

halten auch im Blute erhebliche Mengen von Komplement. Beim Mangel an Meerschweinchen können daher die überall zu findenden Frösche gute Dienste leisten, aber auch Menschen- und Kaninchensera, obgleich weniger brauchbar, können auch als Komplementquelle verwendet werden. — 2) Um den Komplementtiter des Blutserums zu erhöhen, läßt sich die vorläufige (vor 5—7 Tagen) parenterale Einführung der Proteine empfehlen. — 3) Die Modifikation von Bauer ist theoretisch wohl begründet und erweist sich praktisch von Wert, insbesondere für Sera mit kleineren Mengen von Luesambozeptoren. — 4) Die Modifikationen von Hecht, Stern u. a., welche das Komplement der zu prüfenden Sera benutzen, sind theoretisch unbegründet und praktisch unbrauchbar. — 5) Die seit 1—2—3 Wochen entnommenen (obgleich äußerlich gut erhaltenen) Sera wirken eigenhemmend, resp. antikomplementär. Die Erscheinungen, die sich dabei beobachten lassen, täuschen die Bildung der Antikörper (resp. Antikomplement) vor, sollen aber als Ausdruck der physiko-chemischen Veränderungen, die in alten Seris vorgehen, aufgefaßt werden. — 6) Die praktische (resp. klinische) Spezifität der WaR. wird durch unsere Statistik (ca. 2000 Fälle) nochmals bestätigt.

Literatur.

1) Malkine, Kazanski Med. Journ. 1922. Nr. 1. — 2) Stern, Ztschr. f. Immunitätsf. Bd. 1. 1909. H. 3. — 3) Bauer, Sem. Méd. 1908. 2. Sept. — 4) Bauer, Dtsch. Med. Woch. 1909. Nr. 10. — 5) Hecht, Wien. klin. Woch. 1908. S. 1472. — 6) Minz, Ztschr. f. Immunitätsf. 1911. Nr. 1. — 7) Minz, Rußki Wratch. 1910. — 8) Muttermilch et Latapie, Compt. rend. Soc. Biol. T. 86. p. 748. — 9) Horowitz-Wlassowa, Ztschr. f. Mikrobiol. [Russ.] 1915. Nr. 2. — 10) Horowitz-Wlassowa, Wratchebuaïa Gazeta. [Russ.] 1922. — 11) Michaelis, Berl. klin. Woch. 1909. Nr. 16. — 12) Böhm, Münch. Med. Woch. 1909. Nr. 16. — 13) Friedemann, Klin. Woch. 1922. Nr. 3. — 14) Sanssen, Ztschr. f. Tuberk. 1923. Nr. 6.

Experimentelle Arbeiten über die Immunität der Malaria.

[Aus der Mediz. Klinik der Universität in Belgrad (Direktor: Prof. Dr. D. Antić).]

Von Prof. Dr. **D. Antić.**

A. Experimente an Kaninchen.

R. Ross, Grassi, Ziemann und andere haben bewiesen, daß die Malariaparasiten des Menschen sich nur allein in den Anophelinen weiterentwickeln können.

R. Koch bewies durch seine Experimente an verschiedenen Tieren, daß die Malariaparasiten des Menschen nur zwischen Menschen und Anopheles zirkulieren. Er versuchte, verschiedene Tiere mit menschlicher Malaria zu infizieren, so dem Menschen ähnliche Affen; doch gelang es ihm nicht, die menschliche Malaria auf eine Tierart zu übertragen.

Auch unsere Experimente, die wir mit 3 Kaninchen machten, gaben gleiche negative Resultate. Hier im kurzen ihre Protokolle:

Kaninchen Nr. I, 3. 7. 1924. Unmittelbar vor der Inokulation im dicken Tropfen weder Malariaparasiten noch eosinophile Zellen. Leukozyten 5532. Formel: N. 7 Proz., Ly. 85 Proz., Mono 4 Proz., Baso 4 Proz., Eo. 0 Proz. T. 39,5° C.

An demselben Tage wurde es mit Blut inokuliert, das Schizonten und Gameten von Plasmodium vivax enthielt; es bekam 1/4 ccm in die Vene und 3/4 ccm subkutan.

4. 7. Dicker Tropfen: 0. L. 5800. T. 39° C.
5. 7. Dicker Tropfen: 0. L. 6000. T. 38,6° C.
6. 7. Dicker Tropfen: 0. L. 5322. T. 39° C.
7. 7. Dicker Tropfen: 0. L. 2000. T. 39° C.
8. 7. Wiederholte Inokulation mit 1/2 ccm malarischen Blutes, das Gameten und Schizonten von Plasmodium vivax enthielt. Einspritzung subkutan. L. 9632, D. Tr. 0. T. 38,5° C.
9. 7. D. Tr.: 0. L. 9532. T. 38,8° C.
10. 7. D. Tr.: 0. L. 8332. T. 38,4° C.
11. 7. D. Tr.: 0. L. 5832. T. 39,2° C.
12. 7. D. Tr.: 0. L. 9600. T. 38,8° C.
13. 7. D. Tr.: 0. D. Tr.: 0. L. 10400. T. 39° C.

An diesem Tage wurde zum 3. Mal 1/2 ccm Blut, das Gameten und Ringe von Plasmodium vivax enthielt, subkutan eingeimpft.

Von diesem Tage ab bis zum 22. 7. gab die tägliche Untersuchung des dicken Tropfens negatives Resultat. Die Leukozytenzahl bewegte sich zwischen 6300—9600, die Temperatur zwischen 38,6—39,3° C.

Kaninchen Nr. II erhielt 7. 7. subkutan malarisches Blut, das in großer Zahl Gameten und Ringe von Plasmodium falcip. enthielt.

D. Tr. 0. L. 6200. T. 39° C.

Von diesem Tage ab bis zum 22. 7. gab der täglich untersuchte dicke Tropfen negative Resultate. Die Leukozytenzahl schwankte zwischen 4000—7400, T. zwischen 38,3—39° C.

Kaninchen Nr. III. Am 8. 7. intravenös inokuliert mit 1/2 ccm Blut, das in großer Zahl Plasm. falcip. enthielt.

D. Tr. 0. L. 5266. T. 38,6° C.

Von diesem Tage ab wurde der dicke Tropfen täglich untersucht, jedesmal mit negativem Resultat. Leukozytenzahl zwischen 5200—13200, T. 38,6—39,2° C.

Analysis.

Kaninchen I ist mit malarischem Blute, das gewöhnliche Vivax-Gameten und Schizonten enthielt, inokuliert worden. In 5tägigen Intervallen erhielt es teils subkutan, teils intravenös 2 ccm Blut. Während 20 Tagen der Beobachtung, rechnend von der 1. Inokulation, wurden im dicken Tropfen keine Malariaparasiten gefunden; also hatte das Kaninchen keine menschliche Vivax-Infektion bekommen.

Kaninchen II wurde inokuliert mit Malariablut, das reichlich Gameten und Schizonten von falcip. enthielt. Es bekam 1/2 ccm Blut subkutan, doch waren während der 15 Beobachtungstage im dicken Tropfen seines Blutes keine Malariaparasiten zu finden. Es konnte also mit Plasmodium falciparum nicht infiziert werden.

Kaninchen III, inokuliert wie Kaninchen II, bekam 1/2 ccm Malariablut intravenös, das reich an Falcip.-Schizonten und Gameten war. Während 14 Beobachtungstage erschienen in seinem Blute keine Malariaparasiten; also auch dieses Kaninchen bekam die menschliche Malaria perniciosa nicht.

Schluß. Unsere Versuche haben die schon seit Koch bekannte Tatsache bestätigt, daß sich Malariaparasiten, weder Vivax noch Falcip., vom Menschen auf Kaninchen auf experimentellem Wege übertragen lassen. Es bedeutet das, daß das Kaninchen für die menschliche Malaria immun ist. Ob diese Immunität bedingt ist durch die parasitiziden Substanzen im Blute resp. Plasma von Kaninchen, welche die Parasiten, bevor sie sich entwickeln und die roten Blutkörperchen infizieren konnten, vernichten, oder ob die Konstruktion der roten

Blutkörperchen beim Kaninchen eine solche ist, daß die Malariaparasiten in sie nicht eindringen können — müßte erst bewiesen werden.

Vielleicht können unsere folgenden Experimente annähernde Antwort auf diese wichtige Frage geben zugunsten der letzteren Annahme, d. h., daß die Konstruktion der roten Blutkörperchen eine solche ist, daß die Malariaparasiten in sie nicht eindringen können, nicht aber, daß im Blute resp. Plasma parasitizide Substanzen existierten, die die Parasiten vernichten, noch bevor sie sich entwickeln und die roten Blutkörperchen hätten infizieren können.

B. Versuch mit Kaninchenblut bei Malaria in präventivem Sinne.

A. P., 58 Jahre, liegt im Spital mit der Diagnose Emphysema pulmonum. Er litt nie an Malaria. — 26. 7. um 6 Uhr abends erhielt er intramuskulär: 2 ccm Blut, das viele Vivax-Parasiten enthielt + 2 ccm Kaninchenblut miteinander vermischt. Vor der Inokulation im dicken Tropfen keine Parasiten; Leukozytenzahl: 10260.

Vom 27. 7. bis 6. 8. gaben die alltäglichen Untersuchungen des dicken Tropfens negatives Resultat; Leukozytenzahl zwischen 5200—9000, T. 37° C. — 7. 8. Im dicken Tropfen wurden zum erstenmal Vivax-Schizonten gefunden. L. 5866. — 8. 8. D. Tr. spärliche Vivax-Schizonten. — 9. 8. D. Tr. Vivax-Gameten. — 10. 8. D. Tr. spärliche Vivax-Schizonten und Gameten und eosinophile Zellen, die auch vor und nach der Inokulation in jedem Präparate waren. L. 5266. — 13. 8. Beginn der Behandlung mit Chinin per os und Neosalvarsan.

Analysis: Hier wurde Inokulation durch Injektion in die Muskeln mit dem Vivax-Parasiten enthaltenden Blute eines Malariakranken gemacht, welches vorher mit gleicher Menge Kaninchenblut vermischt worden war (āā 2 ccm).

Nach Inkubation von 11 Tagen erscheinen in peripherischen Blute des Inokulierten zum 1. mal Vivax-Parasiten, und zwar zuerst Schizonten und 2 Tage später auch Gameten.

Schluß:

Kaninchenblut, welches mit gleicher Menge Malariakrankenblutes vermischt in die Muskeln injiziert wurde, konnte den Inokulierten vor der Infektion nicht schützen. Nach 11tägiger Inkubation gelang die experimentelle Reproduktion der Malaria vollständig. Man kann nicht sagen, daß die Inkubationszeit verlängert oder die Infektion eine mildere gewesen wäre.

Das bedeutet, daß im gegen menschliche Malaria immunen Kaninchenblute keine Malaria-parasitizide Substanzen existieren. Demgemäß kann man beim Kaninchen die Immunität gegen Malaria nicht irgend welchen parasitiziden Substanzen zuschreiben. Die Malariaparasiten sind für das Kaninchenblut vollständig gefahrlos und irrelevant, und vice versa ist Kaninchenblut für diese Parasiten gefahrlos und irrelevant.

Da es auf diese Weise ausgeschlossen ist, daß die Ursache der Kaninchenimmunität gegen Malaria in parasitiziden Substanzen liege, d. h. in irgend welchen spezifischen Blutbestandteilen, die die Malariaparasiten vernichten, bleibt nur die andere Erklärung der Immunität, daß die Struktur der Kaninchenerythrozyten eine solche ist, daß die Parasiten in sie nicht eindringen und dieselben daher auch nicht infizieren können.

C. Kaninchenblut in der Malaria-Therapie.

Fall 1. K. B., 16 Jahre alt, leidet seit einigen Tagen an rezenter Malaria perniciosa. 26. 7. D. Tr.: winzige falcip.-Ringlein in großer Zahl, ohne Gameten eosinophile Zellen. Temperatur von irregulärem Charakter. Leukozytenzahl: 3460.

An demselben Tage erhält er intramuskulär $1^1/_2$ ccm Kaninchenblut im therapeutischen Sinne, sonst keine anderen Medikamente. — 27. 7. D. Tr.: wie gestern. Leukozytenzahl: 13 720. Er fieberte. — 28. 7. D. Tr.: Falciparum-Ringe in etwas geringerer Zahl. Leukozytenzahl: 6200, febril. — 29. 7. D. Tr.: wie am 28. 7. Leukozytenzahl: 3066; febril. — 30. 7. D. Tr.: geringe Zahl winziger Ringe, keine Gameten. Leukozytenzahl: 5060; febril.

Pat. erhielt die zweite intramuskuläre Injektion von 2 ccm Kaninchenblutes:

31. 7. D. Tr.: wie am 30. 7. Temp. über 40° C. Leukozytenzahl: 5866. Leukozytenformel: N. 33 Proz.; Lymphozyten: 65 Proz.; Mon.: 2 Proz.; Eos. 0 Proz. — 1. 8. D. Tr.: sehr spärliche kleine Ringe, und hie und da unreife Formen von Falciparum-Gameten. Keine Eosinophil. Leukozyten: 7800. — 2. 8. D. Tr.: kleine Ringe, ziemlich zahlreich, spärliche junge Formen von Falcip.-Gameten. Keine Eos. Leukozyten: 6860. — 3. 8. D. Tr.: sehr spärliche unreife Falcip.-Gameten, ohne Ringe und ohne Eos. — 4. 8. D. Tr.: unreife und reife Falcip.-Gameten in geringer Zahl, keine Ringe. Leukozyten: 3400.

Heute Beginn der kombinierten Behandlung mit Chinin + Neosalvarsan:

Fall 2. M. B., 35 Jahre, leidet seit einigen Tagen an frischer Vivax-Malaria, quotidianer Typus. — 26. 7. D. Tr. In großer Zahl Vivax-Schizonten und Gameten. Leukozytenzahl: 3400. Fieberanfall mit Temp. 40° C.

Am selben Tage um $6^1/_2$ Uhr erhielt er zum therapeutischen Zwecke 2 ccm Kaninchenblut intramuskulär. Sonst keine andere Behandlung bis zum 4. 8. 1924. —

27. 7. D. Tr.: etwas weniger Vivax-Schizonten und in mäßiger Zahl Gameten. L. 6466. Fieberanfall mit Temp. 41° C. — 28. 7. D. Tr., in mäßiger Zahl Vivax-Gameten, ohne Schizonten. L. 3860. Fieberanfall Temp. 39,5° C.

Bis zum 3. 8., also 8 Tage nach der Kaninchenblut-Injektion, waren im d. Tr. Gameten in größerer oder geringerer Zahl, einigemale auch Schizonten vorhanden. Leukozytenzahl zwischen 2000—3500, immer mit Prävalieren der Lymphozyten (über 40 Proz.) im Urin Urobilinogen beständig pos. Fieberanfälle wiederholten sich täglich.

Da wir gar keine Wirkung von der Kaninchen-Hämotherapie sahen, ist am 4. 8. die kombinierte Behandlung mit Chinin und Neosalvarsan angefangen worden.

Analysis.

Fall I. Malaria perniciosa (frische Infektion), ausschließlich mit Ringen im Blute, ohne Gameten, Fieber das gewöhnliche, irreguläre. In 5tägigen Intervallen erhält Pat. 2mal intramuskulär Kaninchenblut, im ganzen 3,5 ccm. Sonst keine andere Behandlung. Es kam weder zur subjektiven noch objektiven Reaktion, nicht lokal und nicht allgemein.

Das Steigen der Leukozytenzahl, 24 Std. nach der Injektion von 3600 auf 13 700, ist vielleicht eine Reaktion auf diese, beweisen kann man es aber nicht.

Die Wirkung der Kaninchenblutinjektion auf Falcip.-Parasiten selbst ist augensichtlich gleich Null, denn die Entwicklung der Parasiten schreitet unbehindert fort.

Vor der 1. wie auch vor der 2. Injektion kreisten im paripheren Blute nur Ringe, 6 Tage nach der 1. und 2 nach der 2. Kaninchenblutinjektion erscheinen auch die Falcip.-Gameten. Die Temperatur änderte sich nicht.

Da sich gar keine Wirkung zeigte, weder auf die Parasiten, noch

auf die Temperatur, wurde am 10. Tage nach der 1. Injektion mit der Chinin-Neosalvarsan-Therapie begonnen:

Fall II stellt einen Kranken mit Tertiana dar, der zu therapeutischen Zwecken 2 ccm Kaninchenblut intramuskulär bekam.

Auch bei ihm zeigte sich weder lokale noch allgemeine Reaktion. Die Parasiten waren beständig im Blute, ebenso die alltäglichen Fieberparoxysmen zu bemerken.

Schluß.

Kaninchenblut, intramuskulär in Mengen von 2—3½ ccm bei Kranken mit Malaria perniciosa und tertiana appliziert, zeigte absolut keine kurative Wirkung. Der Kranke bekam seine Fieberanfälle weiter, und die Parasiten entwickelten sich ungestört weiter.

Auch diese 2 Experimente scheinen zu beweisen, daß das Kaninchenblut keine parasitiziden Substanzen enthält, und daß die natürliche Immunität des Kaninchens gegenüber den Malariaparasiten ohne Zweifel auf der besonderen Struktur der Erythrozyten beruht, die nicht erlaubt, daß die Parasiten in sie eindringen, nicht aber in einer Fähigkeit seines Blutes oder seines Plasma, die Parasiten zu vernichten.

Demgemäß verhält sich das Kaninchenblut den Malariaparasiten gegenüber refraktär, nicht aber parasitizid.

Selbstredend genügen unsere Experimente nicht, um definitive Schlüsse ziehen zu können. Aber auf alle Fälle sind sie sehr interessant und verdienen, in größerer Zahl nachgeprüft zu werden, und zwar auch mit größeren Blutmengen.

Immunität der Malariker gegen Superinfektion.

[Aus der Mediz. Klinik der Universität in Belgrad (Direktor: Prof. Dr. D. Antić).]

Von Prof. Dr. **D. Antić.**

Fall 1. J. B., 23 Jahre alt, am 22. 6. ins Spital aufgenommen.

Anfang Juni 1924 1. Fieberanfall, der sich täglich wiederholt; auch hier im Spital während 2 Tagen täglich Schüttellfrost. Im dicken Tropfen: Vivax-Parasiten +. Tumor lienis +. Im Urin Aldehyd +.

Er wurde mit Chinin per os behandelt bis zum Verschwinden der Parasiten aus dem peripheren Blute. Da er nachher noch einige Tage beständig fieberfrei war mit negativem hämatologischen Befunde, wurde er am 7. 7., d. h. 12 Tage nach dem letzten Fieberanfalle, 10 Tage nach positivem Parasitenbefunde im dicken Tropfen, mit 1 ccm Malariablut, das zahlreiche Schizonten und Gameten enthielt, inokuliert. Vor der Inokulation hat er 8 Tage lang kein Chinin bekommen, die Kaliummerkurijodidreaktion mit Urin gab negatives Resultat.

Der Kranke wurde noch 15 Tage nach der Inokulation genau beobachtet. Während dieser Zeit bekam er keine malarischen Anfälle. Auch im dicken Tropfen des peripheren Blutes waren Malariaparasiten nicht zu finden. Urbg. im Urin beständig neg. Die Leukozytenzahl zwischen 4800—8600. In der Formel 2—6 Proz. Eosin., 30—40 Proz. Ly., 3—6 Proz. Mono., 53—62 Proz. Neutroph.

Fall 2. A. N., 21 Jahre alt, in die Klinik am 8. 6. aufgenommen.

1. Malariaanfall am 28. 6. 1924. Im dicken Tropfen zahlreiche Vivax-Ringe. Tumor lienis +. Urbg. +.

Vom 3. 7. bis 9. 7. bekam Pat. Chinin per os und Neos. 0,45. Vom 7. 7. ab im dicken Tropfen beständig neg. Befund. Letzter malarischer Anfall am 3. 7. — 13. 7. intravenös mit 2 ccm Malariablutes, das viele Vivax-Gameten und Ringe enthielt, inokuliert. — 14. 7. Temperaturelevation auf 38,6° C, aber ohne Parasiten im d. Tr. — Bis zum 25. 7. beständig fieberfrei mit neg. Blutbefund. — 5. 7. wiederholte Inokulation mit 2 ccm Malariablutes, das Vivax-Gameten und Ringe enthielt. Inokulation in die Vene.

Nach dieser 2. Inokulation zeigte der Kranke absolut keine Reaktion, hatte keine erhöhte Temperatur und im peripheren Blute kein einziges Mal Malariaparasiten.

6. 8., d. h. 23 Tage nach der 1. und 12 Tage nach der 2. Inokulation, aus der Klinik gesund entlassen.

Analysis.

In beiden Fällen handelt es sich um eine recente spontane Vivax-Malaria-Infektion. Der Fall I hat auf eine perorale Chinin-Medikation in 4 Tagen sowohl die Fieberanfälle, wie die Parasiten aus dem peripheren Blute verloren. 12 resp. 10 Tage nachher ist er endovenös inokuliert worden mit 1 ccm Blut, das zahlreiche Vivax-Schizonten und Gameten enthielt.

8 Tage vor der Inokulation erhielt Pat. keine Medikamente, auch kein Chinin.

Während 15 Tage nach der Inokulation war gar keine Reaktion im peripheren Blute erschienen, auch keine Parasiten. Keine malarischen Anfälle.

Fall II. Der Kranke ist im ganzen 6 Tage mit Chinin per os + 0,45 Neos. behandelt worden. 10 Tage nach dem letzten Malariaanfalle, resp. 6 Tage nach dem letzten positiven Parasitenbefunde im d. Tr. des peripheren Blutes, wurde Pat. endovenös mit 2 ccm Blut inokuliert, das Gameten und Vivax-Ringe enthielt.

Zum 2. male wurde wieder die endovenöse Inokulation gemacht mit 2 ccm Blut, das Vivax-Ringe und Gameten enthielt.

Nur am nächsten Tage nach der 1. Inokulation war eine Reaktion, Temperaturerhöhung auf 38,6° C, zu verzeichnen, aber ohne Erscheinen der Parasiten im peripheren Blute. Die Parasiten waren überhaupt 23 resp. 12 Tage nach der Inokulation im peripheren Blute nicht mehr zu finden.

Schluß.

Der Zweck dieser Untersuchung war, festzustellen, ob der Kranke, wenigstens in der 1. Phase der Konvaleszenz, immun gegen die neue Infektion sei.

Es kann ja in keinem von beiden Fällen die Rede sein von einer Reinfektion, sondern nur von Superinfektion. Es ist unmöglich, zu behaupten, daß mit einer sehr kurzen und höchst ungenügenden Chinin-Behandlung (in beiden Fällen wurde das Chinin im ganzen 6 Tage lang 1 Gr pro die per os verabreicht, im 2. Falle 0,45 Neos. noch dazu), eine völlige Sterilisation des Organismus erreicht wäre. Wenn auch beide Kranke seit einigen Tagen weder Fieberanfälle noch Parasiten im peripheren Blute hatten, bedeutet das nicht, daß sie völlig parasitenfrei waren; im Gegenteil ist es viel wahrscheinlicher, daß sich im Knochenmark und in der Milz noch viele Malariaparasiten verbargen, d. h. daß latente Malaria vorlag.

Das refraktäre Verhalten der Malariker gegenüber der Re-, besser Superinfektion, unmittelbar nach dem Verschwinden der Fieberanfälle

und der Parasiten aus dem peripheren Blute, könnte man biologisch auf zwei Arten erklären, entweder, daß die im Knochenmark und in anderen Organen verborgenen Parasiten von dort eine Art zellulärer oder humoraler Immunität unterhalten, die die Re-, besser Superinfektion verhindert, oder, daß sich die Parasiten total verloren haben, also nicht nur aus dem peripheren Blute, sondern auch aus den inneren Organen, daß aber der Organismus noch eine bestimmte Zeit auf irgend eine Art immun gegen die Reinfektion ist.

Nach der 1. Auffassung müßte man die event. späteren Fieberanfälle (nach vielen Monaten oder Jahren) nicht als eine wiederholte (Re-) Infektion auffassen, sondern als Rezidiv, der 2. gemäß aber solche abermaligen Anfälle als eine echte Reinfektion.

Ob man die Mononukleose im Blute als einen Ausdruck von Immunität eines wirklich deparasitierten Organismus auffassen kann oder als eine Reaktion des Blutes, welche die in den inneren Organen verborgenen Parasiten hervorrufen (latente Malaria), ist schwer zu sagen. Auf alle Fälle soll nach heutiger Auffassung die Mononukleose als Ausdruck der latenten Malaria gelten. Bekanntlich verfügen wir über kein Mittel, das uns die Möglichkeit gäbe, festzustellen, ob ein Mensch, der einmal mit Malaria infiziert war, von ihr ganz geheilt ist.

Daß die Malaria heilbar ist und nicht nur mit Chinin, sondern auch spontan, ist nicht zu bezweifeln.

Demnach sind beide Annahmen möglich: All die Forscher, die sich mit Malariauntersuchungen befaßten, interessierte besonders die Immunitätsfrage, und sie bemühten sich, in das schwere Problem möglichst viel Licht zu bringen, sowohl im praktischen wie im biologischen Sinne. Trotz aller Bemühungen scheinen wir aber von einer definitiven und strikten Lösung dieser Frage noch weit entfernt.

Hier wollen wir die Meinung einiger Autoren anführen:

H. Ziemann: Es scheint, daß sich die Malariker immer von neuem infizieren können. Von dem Borne spricht sogar von der Autoreinfektion durch Anopheles, die sich mit den Gameten desselben Individuums infiziert haben. Ziemann ist geneigt, analog anderen infektiösen Krankheiten(Scharlach, Morbilli, Variola), an eine Art individueller, natürlicher Immunität zu glauben, oder wenigstens an eine Resistenz gegenüber der Malariainfektion. Er glaubte auch an eine durch einmal oder wiederholt durchgemachte Malaria erworbene Immunität. Zugunsten letzterer Meinung sprächen die Fälle erfolgloser experimenteller Infektion.

Ob bei der angeborenen natürlichen Immunität bei Malaria, resp. bei der Resistenz, die absolut oder relativ sein kann, die Buchnerschen Alexine oder Ehrlichschen Antikörper eine Rolle spielen, soll dahingestellt werden.

Eine absolute angeborene Immunität gegenüber Malaria besteht zweifellos nicht, sondern man kann nur zulassen, daß event. eine relative, kurz dauernde Resistenz besteht, die das Kind bei der Geburt von der Mutter erbt.

Zur Erklärung der erworbenen Immunität nimmt Ziemann die Seitenkettentheorie zur Hilfe, um, analog den Wirkungen der Bakterien auf den Organismus, das Entstehen der spezifischen Antitoxine und parasiticiden Substanzen zu erklären. Zu einem bestimmten Schluß konnte er nicht kommen; er glaubt aber, daß man nach Durchmachen der Malaria zu einer relativen Immunität gegenüber dem malarischen Gifte, später aber stufenweise auch zu einer relativen Immunität gegenüber den Parasiten selbst kommen kann.

Parasitolysine, ähnlich den Bakteriolysinen, konnten weder im Serum febriler Malariker, noch in dem von Rekonvaleszenten, noch im Serum oder in Organen von gegenüber Malaria immunen oder refraktären Tieren gefunden werden.

Trotzdem meint Ziemann, daß während der Zeit der Infektion parasiticide Substanzen erscheinen, die die Aufgabe, eine bedeutende Zahl Parasiten zu töten, haben.

Das Resultat all dessen ist: man könne bei Malaria keine Immunitas sterilisans magna erreichen. Meistens hält sich eine gewisse Zahl Parasiten in den inneren

Organen auf. Hier adaptiert sie sich, um nach einer gewissen Zeit aus uns unbekannten biologischen Gründen zu einem manifesten malarischen Anfalll zu führen.

Kolle-Hetsch denken: die Immunität gegenüber Malaria erwirbt man durch mehrere Rezidive resp. durch wiederholte Infektionen, sie ist also eine erworbene, nicht eine natürliche, angeborene.

Die erworbene Immunität ist streng spezifisch; d. h. vorherige Erkrankung an Tertiana schützt nur gegen Tertianaparasiten, nicht aber auch gegen Quartana oder Tropica.

Celli, der in dieser Richtung am meisten experimentierte, sagt, daß die einmal erworbene Malaria gern zu Rezidiven führt und eine Disposition für neue Infektionen schafft, aber keine Immunität.

Vielleicht, aber nicht bestimmt, zeigen eine gewisse natürliche Immunität Individuen, die durch langanhaltende Rezidive kachektisch und sehr anämisch geworden sind und enorme Leber- und Milztumoren besitzen. Wenn es bei solchen zu Reinfektion kommt, ist der Charakter der Krankheit ein milderer, schwächerer.

Wenn es nach einer Malariaerkrankung zu einer gewissen Immunität kommt, ist sie unbeständig und vorübergehend.

Das Serum eines Malarikers, einem Gesunden injiziert, kann jedenfalls weder die Infektion verhindern, noch die Inkubationszeit verkürzen. Diese Experimente sprechen gegen eine spezifische antitoxische Eigenschaft des Serums von Malarikern.

Nicht nur das Serum, sondern auch keines von den Organen, wie Milz, Gehirn, Knochenmark usw., enthält diese spezifischen Antitoxine! Auch die Säfte, durch eine besondere Präparation aus infizierten wie nicht infizierten Anophelinen gewonnen, haben in Experimenten keinerlei immunisierende Eigenschaft gezeigt.

Ehrlichsche sterilisierende Immunität bei Malaria läßt sich mit Chinin erhalten.

Auf jeden Fall gibt es Individuen, die sich refraktär verhalten, die also für die natürliche sowie experimentelle Malariainfektion immun sind.

Zur Verbreitung von Isospora-Infektionen bei Hunden und Katzen in den Niederlanden.

[Aus der Tropenabteilung des Instituts für parasitäre und infektiöse Krankheiten der tierärztlichen Hochschule zu Utrecht (Direktor: Prof. Dr. L. de Blieck).]

Von Dr. **Otto Nieschulz.**

Mit 3 Abbildungen im Text.

Bei Hunden und Katzen kommen, wie zuerst von Wenyon (1923) einwandfrei nachgewiesen wurde, mindestens 3 gute Isospora-Arten vor, nämlich I. bigemina (Stiles), I. rivolta (Grassi) und I. felis Wenyon. Sie unterscheiden sich hauptsächlich durch die Oozystengröße, die bei I. bigemina etwa 12—15 μ, bei rivolta 20—30 μ und bei felis 40—45 μ beträgt, durch die Lokalisation ihrer endogenen Stadien, die sich bei rivolta und felis im Epithel, bei bigemina dagegen subepithelial im Gewebe der Darmzotten entwickeln und durch die Sporulation, die bei rivolta und felis außerhalb des Wirtskörpers, bei bigemina in der Regel im Darmgewebe abläuft.

Neben diesen Isospora-Formen wurden noch 2 Eimeria-Arten beschrieben, Eimeria canis Wenyon beim Hund mit Oozysten von

17—45×11—28 μ, und bei der Katze E. felina Nieschulz, deren Oozysten 21—26×13—17 μ messen. Pospiech (1919) fand außerdem bei einer Katze eine Eimeria-Art, die, soweit nach seiner Beschreibung zu beurteilen ist, näher der E. canis als der E. felina zu stehen scheint. Erwähnt sei schließlich noch, daß Chierici (1908) in der Gallenblase einer Katze Zysten vom Eimeria-Typ von 26 bis 30×17—20 μ Größe angetroffen hat.

Material. In der Zeit vom 10.—30. 9. 1924 untersuchte ich 50 Katzen und 35 Hunde, die im hiesigen Tierasyl getötet waren und aus Utrecht oder seiner näheren Umgegend stammten. Dem Pathologischen Institut der Tierärztlichen Hochschule (Prof. Dr. Schornagel) bin ich für die Überlassung der Kadaver zu großem Dank verpflichtet. Von jedem Tier wurden die Fäzes nach dem Glyzerinanreicherungsverfahren von Vajda (1922), das nach eigenen Erfahrungen und denen meiner Mitarbeiter von allen bisher bekannten Anreicherungsmethoden die besten Resultate gibt, behandelt. Außerdem wurde die Wand des Dünndarms gut abgekratzt und derselben Methode unterworfen, um auch die Oozysten von I. bigemina fassen zu können. Die Untersuchung der Gallenblase auf Kokzidien war stets negativ.





Fig. 1. Freie Sporozysten, a von Isospora bigemina (Stiles), b von Isospora sp. Vergr. 1500×. O. N. gez.

Alle 3 Isospora-Arten konnten festgestellt werden, aber keine Eimeria-Infektion, obwohl ich früher in Utrecht sowohl E. canis wie E. felina angetroffen habe (Nieschulz 1924 a. u. b.).

Isospora bigemina (Stiles 1891), Lühe 1906 (Fig. 1a) wurde nur 1mal, also in 1,2 Proz., im Darmmaterial einer jungen Katze beobachtet. Die Fäzesuntersuchung fiel für bigemina negativ aus, zeigte aber eine gleichzeitige Infektion mit felis. Wie bei der dünnen und sehr leicht reißenden Oozystenmembran dieser Form zu erwarten war, fanden sich nur freie Sporozysten. Diese waren ellipsoid, manchmal leicht asymmetrisch von Form, ihre Membran ziemlich stark, doppeltkonturiert, ohne Stiedasches Körperchen. Alle Sporozoiten waren im Gegensatz zu den Zysten von E. felis desselben Materials voll ausgebildet (es handelte sich um ein höchstens 24 Std. totes Tier). Sie hatten gedrungene wurmförmige Gestalt, einen zentralen, ziemlich gut sichtbaren Kern und teilweise auch 2 schwerer erkennbare[1]) Vakuolen an den Polen. Ein Restkörper fehlte oder bestand nur aus einzelnen zerstreuten Körnern, neben denen manchmal noch eine kleine homogene Kugel auftrat. Die Maße betrugen nach 20 Messungen 9—11,5×7—8,5 μ, im Durchschnitt 10,1×7,8 μ, der Formindex 0,77 (0,64—0,89). Sie stimmen also ziemlich gut mit den Größenangaben aus der Literatur überein: 8—10×7—9 μ (Fink, 1854), und 10,5×7,5 μ (Böhm, 1923).

Isospora sp. (Fig. 1b). Im Darmmaterial eines jungen Hundes

1) Im Gegensatz zu den meisten Eimeria-Arten und der Isospora lacazei (Labbé) der Singvögel, bei denen die Sporozoitenvakuolen durch ihre starke Lichtbrechung gerade die auffälligste Struktur in der Oozyste bilden. Auch in dem Fehlen des Stiedaschen Körperchens und der abgerundeten Form der Sporozysten besteht ein Unterschied zwischen den Hunde- und Katzenisosporen einerseits und Isospora lacazei und der Gattung Eimeria andererseits.

fand ich ziemlich reichlich, in den zugehörenden Fäzes nur in einzelnen Exemplaren, reife, freie Sporozysten (keine ganze Oozysten) einer Isospora-Art von 14—17×8—10 μ, im Durchschnitt 15,5×9,2 μ und einem Formindex von 0,59 (0,50—0,67). Sie waren elliptisch, an einer Längsseite ziemlich häufig leicht abgeplattet, die Sporenmembran deutlich doppeltkonturiert. Die Sporozoiten zeigten typische Gestalt, einen etwa zentralen Kern und teilweise eben erkennbare, polständige Vakuolen. Der Restkörper, meist kompakt, besaß körnige Struktur. Alle Sporozysten, mit Ausnahme einiger deutlich degeneriert erscheinenden, waren voll entwickelt, obwohl auch dieser Hund höchstens 1 Tag tot war.

Zu welcher Art muß diese Form gerechnet werden? Von I. bigemina unterscheidet sie sich durch die Größe und schlankere Gestalt ihrer Sporozysten. Die entsprechenden Maße für I. felis liegen wesentlich höher, in der Länge stimmen sie etwa mit den Sporozysten von I. rivolta überein, die nach Wasielewsky (1904) 15 × 11 μ, nach Pospiech (1919) 16 × 12 μ und nach Reichenow (1921) 14—16 × 9—10 μ messen; sie scheinen aber schlanker zu sein. Von diesen beiden Arten müssen sie außerdem noch getrennt werden, da die Sporogonie schon im Darme abläuft und vielleicht noch wegen der mutmaßlich sehr schwachen Ausbildung der Zystenmembran, worauf das Vorkommen allein als freie Sporozysten im Anreicherungsverfahren (bei rivolta und felis nämlich nie beobachtet) schließen läßt. Ich halte es dafür für wahrscheinlich, daß wir es hier mit einer besonderen Art zu tun haben, doch sind meine Beobachtungen zur Sicherstellung dieser Annahme nicht genügend.

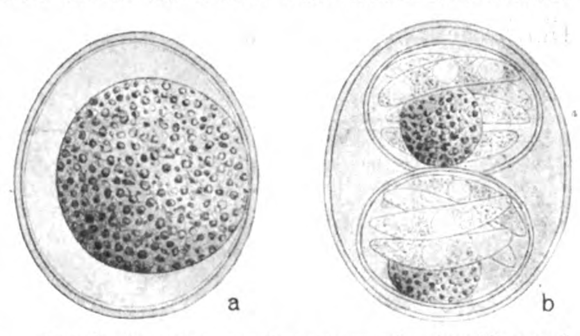


Fig. 2. Oozysten von Isospora rivolta (Grassi). Vergr. 1500×. O. N. gez.

Erwähnt sei hierbei noch, daß auch Davis und Reich (1924) bei einem Hunde, der gleichzeitig mit I. rivolta infiziert war, freie Isospora-Sporozysten von durchschnittlich 17×11 μ fanden, die, nach den Abbildungen zu urteilen, gut mit meinen Formen übereinstimmen. Aus ihrer Beschreibung geht nicht hervor, ob die Zysten im Darm schon sporulieren.

Isospora rivolta (Grassi, 1879), Wenyon, 1923 (Fig. 2). Oozysten von dieser Art wurden bei 6 Katzen und 6 Hunden, also zusammen bei 14,1 Proz. gefunden. Die Form war oval oder ellipsoid bis rund, eine Mikropyle ließ sich nicht nachweisen, die Sporozysten ellipsoid und mit einer starken, doppeltkonturierten Membran versehen. Die Sporozoiten besaßen die übliche Gestalt, einen großen runden, zentralen Kern und manchmal 1 oder 2 eben erkennbare Vakuolen an den Polen. Sie hatten sich teilweise um den meist runden, ziemlich großen Restkörper gekrümmt, häufig aber lagen sie gestreckt neben ihm. Die Maße betrugen für 20 Oozysten aus einer Katze 22—28×18—25 μ, im Durchschnitt 25,5×22,5 μ mit einem Formindex von 0,88 (0,81 bis 0,96), für 20 Exemplare vom Hund 20—25×17—23 μ, bzw. 22×20 μ

und 0,87 (0,77—0,96). Die Formen aus der Katze waren also etwas größer, ihre Gestalt etwa dieselbe. Ähnliche Größenangaben machen auch andere Untersucher, so Grassi (1882—1883) 27—30,8×22—24 μ, Wasielewsky (1904) 22—25×18—22 μ, Hall und Wigdor (1918) 20×18 μ, 30×22 μ, (Pospiech 1919), 21—14×18—20 μ, (Reichenow 1921), 20—24×15—20 μ, (Wenyon 1923) und 25—30×20—25 μ (Davis und Reich, 1924).

Isospora felis, Wenyon 1923 (Fig. 3). Diese Art, die nur bei Katzen vorkommt, wurde 7mal, also in 14 Proz. gefunden. Die Form der Oozyste war oval, meist an einem Pol deutlich, häufig flaschenförmig zugespitzt, manchmal ebenfalls am gegenüberliegenden Ende, wenn auch weniger stark. Eine deutliche Mikropyle bestand nicht. Die Größe betrug nach 20 Messungen 39—44×32—36 μ, im Durchschnitt 42,4×33,4 μ, der Formindex 0,79 (0,73—0,90), sie ist

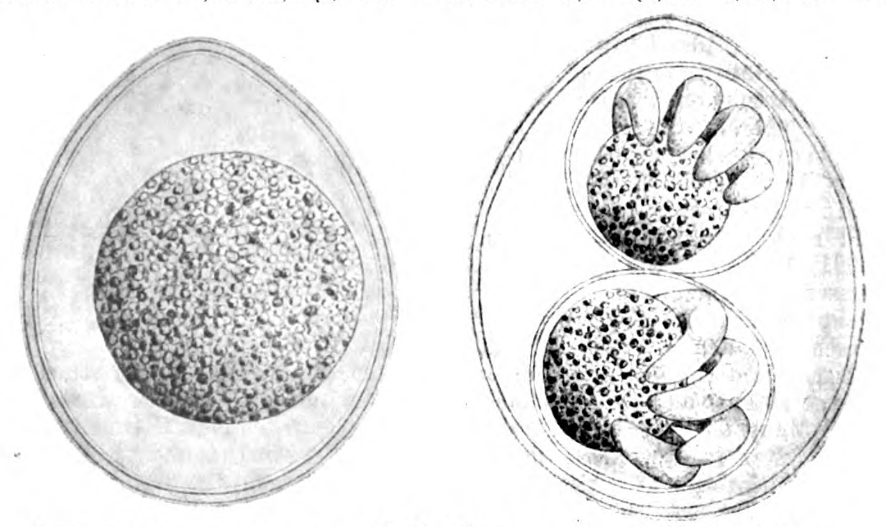


Fig. 3. Oozysten von Isospora felis Wenyon. Vergr. 1500×. O. N. gez.

also bei weitem die größte Form. Wasielewsky (1904) gibt 35 bis 40×23—28 μ, Swellengrebel (1914) 39—47×26—37 μ, Hall (1917) und Hall und Wigdor (1918) 36—40×28—32 μ, Pospiech (1919) 40—41×31—32 μ, Marotel (1921) 45—48×34—36 μ, Wenyon (1923) 39—48×26—37 μ, Böhm (1923) 41×31 μ und Davis und Reich (1924) 35—47×27—40 μ als Maße an. Die Sporozysten waren rund oder etwas elliptisch, der Sporozystenkörper sehr groß. Die Sporozoiten lagen stets bogenförmig gekrümmt zwischen Restkörper und Membran; ihr Kern war rund, ziemlich groß, fast gleich dem Querdurchmesser des Sporozoiten; vakuolenähnliche Strukturen ließen sich gelegentlich, wenn auch undeutlich, in der Nähe der Enden erkennen.

Zusammenfassung.

Es wurden von 50 Katzen und 35 Hunden Fäzes und Darmwand auf Kokzidienzysten nach dem Glyzerinanreicherungsverfahren Vajdas untersucht und hierbei Isospora bigemina bei 1 Katze, I. ri-

volta bei 6 Hunden und 6 Katzen, I. felis in 7 Katzen und bei 1 Hunde Sporozysten einer wahrscheinlich neuen Isospora-Art gefunden.

Utrecht, im Oktober 1924.

Literaturübersicht.

Böhm, L. K., Morphologische und experimentelle Beiträge zur Kenntnis der Hunde- und Katzenkokzidiose. (Wien. tierärztl. Monatsschr. Jg. 10. 1923. S. 137 bis 140.) — Chierici, G., Note di parasitologica. La coccidiosi epatica nel gatto. (Il nuove Ercolani. Vol. 13. 1908. p. 54.) — Davis, N. C., und Reich, W. W., Notes on coccidial oocysts from domestic animals in California. (Journ. of Parasit. Vol. 10. 1924. p. 137—146). — Finck, H., Sur la physiologie de l'épithélium intestinal. [Thèse.] Strassbourg 1854. — Grassi, B., Sur quelques protistes endoparasites appartenant aux classes des flagellata, lobosa, sporozoa et ciliata. (Arch. Ital. de Biol. Vol. 2. 1882. p. 402—444; Vol. 3. 1883. p. 23—37.) — Hall, M. C., Parasites of the dog in Michigan. (Journ. Americ. vet. med. Ass. Vol. 51 [N. S. 4.] 1917. p. 383—396.) — Hall, M. C., and Wigdor, M., Canine coccidiosis, with a note regarding other protozoan parasites from the dog. (Ibid. Vol. 53. 1918. (N. S. 6.) p. 64—76.) — Marotel, G., Sur une nouvelle coccidie du chat. (Bull. Soc. Sci. vétér. Lyon 1921. p. 86.) — Nieschulz, O., Over een geval van Eimeria-infectie bij een kat (Eimeria felina n. sp.) (Tijdschr. v. Diergeneesk. Deel 51. Utrecht 1924. p. 129—131.) — Ders., Ein weiterer Fall von Eimeria canis Wenyon. (Berl. tierärztl. Woch. Jg. 40. 1924. p. 220—221.) — Pospiech, W., Untersuchungen über den mikroskopischen Nachweis von Darmparasiten im Kot von Fleischfressern, mit besonderer Berücksichtigung der Coccidien. [Vet.-med. Inaug.-Diss.] München 1919. — Reichenow, E., Die Coccidien. (In Prowazek-Nöller, Handb. d. Protozoen. Bd. 3. 1921. S. 1136—1277.) — Vajda, T., A new method for detecting the eggs of parasites in feces. (Journ. Americ. vet. med. Ass. Vol. 61. [N. S. 14.] 1922. p. 534—536.) — Wasielewsky, T. v., Studien und Mikrophotogramme zur Kenntnis der pathogenen Protozoen. H. 1. Leipzig 1904. — Wenyon, C. M., Coccidiosis of cats and dogs and the statuts of the Isospora of man. (Ann. trop. Med. a. Parasit. Vol. 17. 1923. p. 231—288.)

Zur Verbreitung des medizinischen Blutegels (Hirudo medicinalis L.) in Süddeutschland.

Von **R. Vogel**, Tübingen.

Hirudo medicinalis L. wurde im Laufe des 19. Jahrhunderts in Deutschland infolge der medizinischen Verwendung, insbesondere durch den Export der Tiere nach Frankreich und England, immer seltener. In vielen Gegenden, wo der Blutegel früher häufig war, wie z. B. in Franken, war er nach Fr. Leydigs Angaben (Horae zoologicae) gegen Ende des 19. Jahrhunderts ausgerottet.

Aus der heutigen Verbreitung des Egels in Deutschland läßt sich insofern kein ganz klares Bild gewinnen, als man vielfach nicht entscheiden kann, ob es sich um Nachkommen von früheren Blutegelzuchten oder um „wilde“ Nachkommen handelt.

Sicher ist wohl, daß, als man in der 2. Hälfte des vorigen Jahrhunderts mehr und mehr von der medizinischen Verwendung des Egels

abkam, dieser sich an geeigneten Orten wieder langsam auf natürlichem Wege — d. h. ohne Aussetzung — vermehren und wieder ausbreiten konnte. Die in den meisten Lehr- und Handbüchern angegebenen Verbreitungsorte dürften wohl nur einen geringen Teil des Reliktengebietes ausmachen. In Brehms Tierleben (4. Aufl. Bd. 1. 1918) werden nur 3 deutsche Fundplätze aufgezählt, nämlich Borkum, der Hautsee bei Marksuhl in Thüringen und mit Vorbehalt Mieselstein im Allgäu. Die gleichen Angaben finden sich in Brauers Süßwasserfauna, Bd. 13 (L. Johansson, Hirudinea). In Brohmers Fauna von Deutschland (2. Aufl.) steht: „Wild nur noch an 2—3 Fundorten, z. B. auf Borkum." In M. Brauns „Die tierischen Parasiten des Menschen" (5. Aufl.) findet man keine Angaben über die Verbreitung.

Neue Erhebungen über die gegenwärtige Verbreitung des Blutegels in Deutschland dürften unter Berücksichtigung der oben erwähnten Schwierigkeit ein viel größeres authochthones Verbreitungsgebiet ergeben.

Für Württemberg kann ich folgende Angaben machen: Ganz sicher kommt der Blutegel noch im Rohrsee bei Wolfegg in Oberschwaben vor, und zwar „wild". Der ca. 52 ha große fisch- und schneckenreine See, an welchen an einer Stelle Siedelungen anstoßen, bietet dem Tier günstige Existenzbedingungen. In der Stuttgarter Naturaliensammlung befinden sich Exemplare vom Rohrsee aus den Jahren 1869—74. Auch in dem statistischen Werke „Das Königreich Württemberg" (Bd. 1) vom Jahre 1882 wird der Rohrsee als Fundort angegeben. 1908 wurde er gelegentlich einer von Prof. F. Blochmann geleiteten zoologischen Exkursion am Rohrsee festgestellt, im Juni 1923 wurden von mir gelegentlich eines Lehrausfluges mehrere Blutegel am Ufer des Sees, und zwar in unmittelbarer Nähe der Gehöfte des Dorfes Rohr beobachtet. Wie mir Herr Dr. O. Kuhn-Göttingen mitteilt, hat auch er den Egel am Rohrsee in den letzten Jahren gesehen.

Ueber eine frühere Blutegelzucht am Rohrsee ist nichts bekannt.

Als weitere Stelle des heutigen Vorkommens des Blutegels führe ich die „Lache" an, ein Altwasser des Neckars bei Altenburg (ca. 12 km unterhalb Tübingens am Neckar). Ein 1903 in diesem Gewässer gefangener Egel befindet sich in der Sammlung des Zoologischen Institutes Tübingen. Anfang September 1923 erbeutete ich aus dem Schlamm der Lache 2 Blutegel, wovon der eine erwachsen, der andere nur mittlerer Größe war. Es ist also kein Zweifel, daß die Tiere sich in der Lache vermehren. Das kleinere Exemplar enthielt noch 2 Monate nach der Gefangennahme wohlerhaltene rote Blutkörperchen im Darm, deren elliptische Form und Kernhaltigkeit (die Kerne färbten sich noch recht gut mit Hämatoxylin) auf Herkunft von Fischen oder Amphibien schließen lassen. Ich stellte Schleien in den Gewässern fest. Im Oktober 1924 zählte ich im Verlauf einer Viertelstunde etwa 10 zwischen Unkraut herumschwimmende Egel.

Nach mündlichem Bericht ist der Blutegel in den Sommermonaten häufig in der „Lache", die in dieser herumwatende nacktbeinige Dorfjugend wird regelmäßig von ihm angegiffen. Soweit mündliche Berichte zurückgehen (1830), sind immer Blutegel in der Lache gewesen, von einer früheren Zucht ist nichts bekannt.

—

So wird sich bei genauerem Zusehen der Blutegel auch noch an anderen Stellen nachweisen lassen. Nach Angaben des Herrn cand. rer. nat. Schüz-Stuttgart kommt der Blutegel im Roßweiher bei Maulbronn noch vor, wo Sch. von dem Egel öfters angegriffen wurde. Als Fundorte aus der 2. Hälfte des vorigen Jahrhunderts sind (teils aus dem Werke „Das Königreich Württemberg" (1882), teils aus Vermerken der Stuttgarter Naturaliensammlung) noch bekannt der Schweigfurter See, die Teiche bei Sersheim und Illingen (hier befand sich früher eine Blutegelzucht), die Weiher bei Zang, Haslach, Blitzenreute, Kayh (bei letzterem, nahe Herrenberg gelegenen Orte finde ich den Blutegel 1923 nicht mehr).

In dem zum badischen Grenzgebiet gehörigen Schwenninger Moor wurde der Blutegel vor einigen Jahren durch Schlenker festgestellt (Jahresh. d. Ver. f. Vaterl. Naturk. Jahrg. 64. 1908. 2. Beil. Mitt. d. geol. Abt. d. Statist. Landesamtes). Lauterborn, der treffliche Kenner der oberrheinischen Fauna, gibt in „Das Leben der Binnengewässer" (3. Aufl. S. 317) das Vorkommen des Blutegels in den pflanzenreichen Altwässern des Oberrheines an[1]).

Vielleicht geben diese Zeilen Veranlassung, auch in anderen Gebieten Deutschlands die Verbreitung des Blutegels erneut zu prüfen.

Von dem Pferdeegel unterscheidet sich der Blutegel bekanntlich u. a. dadurch, 1. daß er Blut von Warmblütern saugt (der Pferdeegel saugt vornehmlich an Schnecken), 2. durch den größeren hinteren Saugnapf, der etwa $^2/_3$ so breit wie das Hinterende — beim Pferdeegel nur $^1/_3$ so breit wie dieses ist, 3. durch den Besitz von je 3 seitlichen rostfarbenen Längsstreifen auf der Rückenseite, welche beim Pferdeegel fehlen.

Nachdruck verboten.

Ueber die inperitoneale Reaktion.

Vorläufige Mitteilung.

[Aus dem Staatsinstitut für medizinische Wissenschaften.]

Von Prof. **B. Ebert** und **M. Wassiliewa**.

Gelegentlich der Prüfung der Reaktionsfähigkeit verschiedener Gewebe (Haut- und Unterhautgewebe) von immunisierten und nicht immunisierten Tieren auf die Einführung lebender Bakterien wurden von uns analoge Versuche auch an dem parietalen und viszeralen Peritonealblatt ausgeführt. Wir bedienten uns dabei der folgenden Technik:

Unter den üblichen aseptischen Kautelen laparotomierten wir Kaninchen und spritzten in das parietale Blatt des Peritoneums 0,05—0,1

---

1) Herr Geheimrat M. Braun-Königsberg teilt mir soeben brieflich mit, daß in Ostpreußen der Blutegel noch in einer ganzen Anzahl von Seen vorkommt. Es handelt sich nach seiner Ueberzeugung um natürliches Vorkommen.

ccm Staphylokokkenemulsion[1]) (1 Normalöse auf 20—50 ccm physiol. Kochsalzlösung verdünnt) derart ein, daß eine leicht erhabene Quaddel entstand. Darauf wurde der Schnitt der Peritonealserosa mit der unterliegenden Bauchmuskulatur und weiter die Haut mittels einiger Nähte vernäht. Nach 3—5 Tagen töteten wir das Versuchstier, schnitten den entsprechenden Teil der Bauchwand in der Umgebung der Wunde aus und untersuchten seinen Zustand derselben von der Serosa-Seite aus.

Die Ergebnisse unserer Versuche zeigen, welche Bedeutung der Art der vorangegangenen Immunisierung der Tiere zukommt. Bei den durch direkte Einführung der Bakterien ins Cavum peritoneale immunisierten Kaninchen war die Reaktion gering, zuweilen gleich null[2]), bei den per os immunisierten war sie unbedeutend, bei den intravenös immunisierten schon schärfer ausgeprägt, während bei den Kontrolltieren (also nicht immunisierte Tiere) in der Mehrzahl der Fälle bereits stark ausgesprochene Suppuration und oft Peritonitis adhaesiva angetroffen wurden.

Wir glauben, damit eine Methode vorschlagen zu können, die uns erlaubt, einen Schluß auf den Immunzustand des Tieres mit Berücksichtigung der Lokalimmunität zu ziehen. Selbstredend ist dieser Versuch auch zur Beurteilung der unspezifischen Resistenzsteigerung der Tiere anwendbar. Die weitere Ausarbeitung dieser Methode unter Anwendung anderer Bakterienkulturen ist von uns in Angriff genommen.

1) Eine, wie bekannt, für Kaninchen fast apathogene Bakterienart bei dem gewöhnlichen Modus der Injektion ins Cavum peritonei.

2) Nichtsdestoweniger wurden auch hier wie bei der Kontrolle zahlreiche Staphylokokken gefunden. Diese Tatsache scheint uns, wie wir bald zu zeigen hoffen, bedeutungsvolll zu sein.

Inhalt.

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena — 5295

Centralbl. f. Bakt. etc. I. Abt. Originale. Bd. 94. Heft 3/4.

Ausgegeben am 18. Februar 1925.

Das Ektoplasma der Bakterien.

II. Mitteilung: Ueber färberische Verschiedenheiten zwischen grampositiven und gramnegativen Bakterien[1]. Ein Beitrag zur Theorie der Gramschen Färbung.

[Aus der Parasitologischen und Vergleichend-pathologischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin (Direktor: Geheimrat Prof. Dr. Lubarsch).]

Von Dr. med. **M. Gutstein,** Berlin.

Mit 1 Tafel.

Die in der vorausgegangenen Mitteilung beschriebene Methode zur Darstellung des Ektoplasmas ist nicht nur auf die dort erwähnten Mikroben (B. der Diphtherie, Staphylo-, Strepto-, Pneumokokken, Hefe), sondern auch auf alle übrigen grampositiven Bakterien anwendbar (B. des Anthrax, Tetanus, Mesentericus etc.). Als nun der Versuch unternommen wurde, auch die gramnegativen Bakterien in den Kreis dieser Untersuchungen zu ziehen, ergab sich die sehr merkwürdige Tatsache, daß das Ekteplasma der letzteren sich mit dieser Methode nicht darstellen läßt. Behandelt man nämlich Objektträgerausstriche der Gramnegativen (Typhus, Paratyphus, Coli, Dysenterie) mit der beschriebenen 5proz. Tanninlösung und läßt darauf einen basischen Farbstoff einwirken, so erscheinen die Bakterien entweder total und kräftig gefärbt, oder aber sie nehmen nur wenig von dem Farbstoff an, und zwar erhält man das erstere Resultat, wenn man stark färbende und leicht eindringende Farbstoffe (Fuchsin, Malachitgrün) verwendet und das letztere, wenn man andere nimmt, resp. die Färbung nur kurze Zeit einwirken läßt. Besonders klar tritt der Unterschied zwischen den Grampositiven und -negativen zutage, wenn man die Färbung simultan auf einen Objektträger vornimmt.

1. Versuch. Auf einen Objektträger werden Diphtherie- und Coli-Bakterien an 2 verschiedenen Stellen ausgestrichen und in der üblichen Weise fixiert. Läßt man darauf 2 Min. lang eine Tanninlösung (5proz.) einwirken, spült gründlich mit Leitungswasser ab und färbt mit Anilinwassergentianaviolett nach ($^1/_2$—5′), so zeigen die Diphtheriebazillen nur ein schmales äußeres Ektoplasma und ein helles Zentrum, während die Coli-Stäbchen total und stark violett gefärbt sind (Fig. 1a und b).

Noch deutlichere Resultate erhält man, wenn man der Ektoplasmadarstellung eine Färbung des Endoplasmas vorausschickt.

2. Versuch. Auf einen Objektträger werden, wie im vorhergehenden Versuch, Diphtherie- und Dysenterie-(Flexner)-Bakterien an 2 verschiedenen Stellen ausgestrichen, hitzefixiert und 2 Min. mit Brillantgrün (1proz. wäßrige Lösung) behandelt. Nach dem Abspülen läßt man 2 Min. lang 5proz. Tannin einwirken,

---

1) Auszugsweise mitgeteilt auf dem Kongreß der Deutschen Vereinigung für Mikrobiologie 12.—14. Juni 1924 (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 93. S. 236.

spült wiederum gründlich ab und läßt darauf 1 Min. lang eine 1proz. wäßrige Fuchsinlösung einwirken: Die Diphtheriebakterien zeigen einen grünen Leib und ein schmales, leuchtendrotes Ektoplasma. Hingegen sind die Coli-Stäbchen stark rot (Fig. 1c, d).

Dieselben Resultate erhält man auch mit den grampositiven Kokken und negativen Typhusbakterien.

3. Versuch. Je 1 Oese einer Staphylokokken- und Typhuskultur werden zusammen in einem Tropfen physiol. Kochsalzlösung verrieben und davon Objektträgerausstriche hergestellt.

a) Die Ausstriche werden mit Methylenblau 2 Min. gefärbt, abgespült, mit 5proz. Tannin 2 Min. behandelt, wiederum gründlich mit Wasser abgespült und dann kurz (3—5 Sek.) mit Karbolfuchsin nachbehandelt. Die Kokken sind blau gefärbt und weisen einen schmalen, schwach rötlichen Rand auf. Hingegen erscheinen die Typhusstäbchen leuchtend rot (Fig. 2 a).

b) Die Ausstriche werden 2 Min. mit Fuchsin kalt gefärbt, abgespült, 2 Min. mit 5proz. Tannin nachbehandelt, wiederum abgespült und dann kurz (5—10 Sek.) mit Karbolmethylenblau nachgefärbt: Die Kokken sind rot gefärbt, mit sehr schmalem, bläulichem Rand, während die Typhhusstäbchen rein blau erscheinen (Fig. 2b).

Dieses Verfahren erscheint geeignet, als Ersatz für die Gramsche Färbung zu dienen. Vor letzterer hat es den Vorzug, daß es schönere Kontraste liefert (grün-rot, rot-blau, blau-rot), die Herstellung der Präparate in kürzerer Zeit gestattet (ca. 4—5 Min. Färbedauer) und außerdem gänzlich ohne Jod arbeitet.

Wenn man sich die Frage vorlegt, worauf denn eigentlich dieses verschiedene Verhalten der grampositiven und gramnegativen Bakterien bei diesem Färbeverfahren beruht, so erscheint soviel sicher, daß die Tanninlösung in der verwandten Konzentration (5proz. Lösung) bei den Gramnegativen offenbar keine abdichtende Wirkung ausübt. Deshalb färben sich letztere Bakterien im Gegensatz zu den grampositiven trotz vorausgeschickter Tanninbehandlung in voller Größe mit dem nachfolgenden basischen Farbstoff. Aus demselben Grunde erhält man bei Doppelfärbungen (z. B. Brillantgrün-Tannin-Karbolfuchsin) die Gramnegativen in der Farbe des zuletzt angewandten Farbstoffes, weil der 2. Farbstoff, der trotz Tanninbehandlung in das Bakterium eindringt, den ersteren Farbstoff extrahiert und sich an seine Stelle setzt, sogenannte Substitutionsfärbung.

Man könnte allerdings auch den Unterschied zwischen Grampositiven und Gramnegativen darauf zurückführen wollen, daß letztere überhaupt keine Ektoplasmahülle besäßen. Aber abgesehen davon, daß diese Annahme schon aus rein theoretischen Gründen unwahrscheinlich ist, läßt sich bestimmt beweisen, daß sie nicht zutrifft. Wir werden später über Methoden berichten, die auch das Ektoplasma der Gramnegativen isoliert und in Kombination mit einer Endoplasmafärfung darzustellen gestatten.

Wenn demnach alle Mikroben, auch die gramnegativen, eine Oberhaut besitzen, so kann der durch die Versuche 1—3 nachgewiesene Unterschied zwischen den Grampositiven und -negativen (Unmöglichkeit der Darstellung des Ektoplasmas der letzteren durch die Tanninmethode) nur dadurch erklärt werden, daß die Grampositiven einerseits und die Gramnegativen andererseits ein verschieden gebautes Ektoplasma besitzen. Ob die Unterschiede physikalischer oder chemischer Natur sind, mag vorläufig unentschieden bleiben und ist auch zunächst für die in Frage stehende Untersuchung ohne größere Bedeutung. Weisen aber die gramnegativen Arten ein anders gebautes

Ektoplasma auf, so drängt sich von selbst die Frage auf, ob die Gramsche Färbung mit dieser Tatsache in ursächlichem Zusammenhang steht. Zu diesem Zwecke wurden die folgenden Versuche ausgeführt:

4. Versuch. Die Staphylokokken-Typhusausstriche vom vorhergehenden Versuch werden 2 Min. mit einer 5proz. Tanninlösung behandelt, mit Wasser gründlich abgespült, 3 Min. mit Anilinwassergentianaviolett gefärbt, nach Abgießen der Farblösung 2 Min. nachbehandelt mit Lugolscher Lösung und dann in absolutem Alkohol so lange differenziert, bis keine Farbe mehr abgeht, mit Wasser abgespült und kurz (5—10 Sek.) mit Ziehlscher Lösung nachgefärbt. Mikroskopisch zeigen die Typhusstäbchen eine rote Farbe, während die Kokken einen blauvioletten Ektoplasmaring mit einem schwach gefärbten Leib aufweisen (Fig. 2c).

Auch an der größeren und daher übersichtlicheren Hefezelle läßt sich nach vorausgeschickter Tanninbehandlung nach Grams Methode nur das Ektoplasma färben und die Färbung hält der Differenzierung in absolutem Alkohol stand (Fig. 5).

Durch die vorausgegangene Tanninbehandlung hat sich also nur das Ektoplasma des Staphylococcus und der Hefezelle nach Gram gefärbt und der Alkoholdifferenzierung widerstanden, so daß der nach folgende Farbstoff, Fuchsin, nicht aufgenommen werden konnte. Aus diesem Versuch geht mit Sicherheit hervor, daß das Ektoplasma der Grampositiven gramfest ist, d. h. mit Gentianaviolett-Jod eine in absolutem Alkohol unlösliche Verbindung bildet. Man könnte nun den Einwurf machen, daß die Typhusbakterien (gramnegativ) nur deswegen in Versuch 4 rotgefärbt erscheinen, weil sie infolge der Tanninvorbehandlung die Gramsche Färbung überhaupt nicht angenommen hätten. Daß diese Annahme nicht zutrifft, beweist der folgende Versuch:

5. Versuch. Ein Staphylokokken-Typhusausstrich wird 2 Min. mit Tannin behandelt, mit Wasser abgespült, dann kurz ($1^1/_2$—2 Min) mit Anilinwassergentianaviolett gefärbt, nochmals mit Wasser abgespült, mit Lugolscher Lösung 2 Min. gebeizt und zur Beseitigung der Niederschläge kurz mit Alkohol abgespült.

Im Mikroskop erscheinen die Typhusstäbchen blauviolett gefärbt, während die Staphylokokken nur eine ganz schwache Ektoplasmafärbung aufweisen (Fig. 2d).

Durch diese nicht vorschriftsmäßig erfolgte (Wasserspülen vor dem Lugol!) und nicht in Alkohol differenzierte Färbung nach Gram ist also quasi eine Umkehrung der Gramschen Färbung erfolgt. Jedenfalls geht aber aus diesem Versuch eindeutig hervor, daß auch die gramnegativen Typhusbakterien die Gramsche Färbung annehmen; demnach sind sie nur deswegen gramnegativ, weil sie bzw. ihr Ektoplasma mit Gentianaviolett-Jod eine Verbindung bilden, die im Gegensatz zu dem der grampositiven in absolutem Alkohol löslich ist.

Ist diese Annahme zutreffend, d. h. ist nur das Ektoplasma der grampositiven Bakterien für das positive Ergebnis nach der Gramschen Methode allein maßgebend, so müßten diese Mikroben nur so lange gramfest sein, als sie noch ein intaktes Ektoplasma besitzen; und ferner müßten sie diese Eigenschaft verlieren, sobald dasselbe durch Einwirkung irgendwelcher chemischer Reagentien zerstört worden ist. Zu diesem Zwecke wurden an der stark grampositiven Hefe die folgenden Versuche vorgenommen:

6. Versuch. Hitzefixierte Hefeausstriche werden 24 Std. lang in eine Cüvette mit frisch bereitetem Schweizers Reagens gestellt, hierauf gründlich mit Wasser abgespült und nach Gram gefärbt: Alle Zellen sind dunkelblauviolett, also grampositiv (Fig. 3a).

Färbt man die ebenso mit Schweizers Reagens vorbehandelten Ausstriche mit Karbolfuchsin (oder Fuchsin 2—5 Min.), differenziert in 5proz. Essigsäure, bis

die Ausstriche rosa erscheinen, behandelt mit Tannin 2 Min. lang, spült mit Wasser ab und färbt mit 1proz. wäßrigem Methylenblau nach (1/4—1/2'), so zeigen die Zellen einen blauen Ektoplasmaring und einen schwach gefärbten Leib. Im Zelleib sind 1—2 kleine, exzentrisch gelagerte, rote Granula (Nucleolus), die oft von einem hellen Hof umgeben sind (Fig. 3b).

Färbt man so vorbehandelte Hefeausstriche mit Methylenblau, Pyronin, den typischen Farbstoffen für die sauren Nukleoproteide und die freie Nukleinsäure, so erscheinen die Zellen farblos. Diese sauren Eiweiße sind also, wahrscheinlich durch das im Schweizer Reagens enthaltene Ammoniak herausgelöst worden. Der Versuch 6 lehrt also, daß 1) die Nukleoproteide sicher nicht mit der Gramschen Färbung zusammenhängen, und 2) daß an den Hefezellen sich ein Ektoplasma darstellen läßt, solange die Gramsche Färbung trotz Vorbehandlung positiv ausfällt.

Daß auch der umgekehrte Satz zu Recht besteht, d. h. sobald das Ektoplasma sich nach der Tanninmethode nicht mehr darstellen läßt, ist die Hefezelle gramnegativ, lehren die folgenden Versuche:

7. Versuch. Hitzefixierte Hefeausstriche werden 24 Std. lang in eine Cüvette mit konzentrierter Salzsäure (Ac. mur. conc.) gestellt. Spült man die Ausstriche gleich nach dem Herausnehmen aus der Salzsäure ab, so bleibt fast nichts mehr vom ausgestrichenen Material auf dem Objektträger zurück. Daher wurden die Objektträgerausstriche nach der Herausnahme aus der konzentrierten Salzsäurelösung zunächst an der Luft getrocknet, nochmals 2—3mal durch die Flamme des Bunsen-Brenners gezogen und dann gründlich abgespült und

a) nach Gram gefärbt und mit verdünnter Ziehlscher Lösung nachgefärbt: alle Zellen sind rot, also gramnegativ (Fig. 3c);

b) mit Tannin 2 Min. behandelt, abgespült und 1 Min. mit 1proz. Methylenblaulösung nachgefärbt. Die Hefezellen sind total etwas fleckig blau gefärbt, ein Ektoplasma ist nicht mehr nachweisbar (Fig. 3d).

Da die Behandlung mit konzentrierter Salzsäure ein ziemlich eingreifendes Verfahren darstellt, das den größten Teil der Hefezellen vernichtet bzw. vom Objektträger ablöst, so wurde nach einer weniger eingreifenden Methode gesucht, die ebenfalls das Ektoplasma zerstört. Dafür erwies sich ein längeres Kochen mit verdünnter Salzsäure als ausreichend:

8. Versuch. 10 g Hefe werden mit 100 ccm einer 2proz. Salzsäure (Ac. mur. conc. 2 Aqua destill. ad 100) ca. 2 Std. lang gekocht und dann filtriert. Das Filtrat reduziert Fehlingsche Lösung und gibt eine positive Trommersche Probe, wohl durch Aufspaltung der Nukleinsäure, die bekanntlich ein Kohlenhydrat enthält. Vom Sediment werden Objektträgerausstriche hergestellt, hitzefixiert und zur Entfernung der Salzsäurereste gründlich mit Leitungswasser abgespült. Färbt man einen solchen Ausstrich nach Gram, so erscheint ein Teil der Zelle, besonders oft die Peripherie, rot, während der Rest noch stark violett erscheint. Stellt man dagegen diese Ausstriche vor der Färbung in eine Cüvette mit Alkohol absolutus oder mit Alkohol und Benzin ää und läßt sie darin 24 Std. verweilen und färbt dann nach Gram, so erscheinen alle Hefezellen rot[1]).

Nur hin und wieder sieht man den Nucleolus noch violett gefärbt. Färbt man dieselben Ausstriche nach Alkoholextraktion, nach einer Ektoplasmamethode, z. B. mit Tannin-Safranin, so ist ein Ektoplasma nicht mehr darstellbar; die Zellen sind in toto rosa gefärbt.

Da die Gramsche Färbung ein gewisses subjektives Moment hinsichtlich der Dauer der Differenzierung (bis keine Farbstoffwolken mehr abgehen) enthält, so wurde der folgende Versuch ausgeführt:

1) Makroskopisch sind die Ausstriche nach der Herausnahme aus dem Alkohol völlig entfärbt.

9. Versuch. Auf einen Objektträger wird an 3 verschiedenen Stellen normale Hefe, Hefe, welche 2 Std. mit 2proz. Salzsäure und solche, die 2 Std. mit 5proz. Salzsäure gekocht wurde, ausgestrichen, nach dem Antrocknen hitzefixiert, mit Leitungswasser abgespült, getrocknet und für 24 Std. in Alkohol absolutus gestellt und

a) nach Gram gefärbt, nach der Differenzierung mit verdünnter Ziehlscher Lösung 1 Min. nachgefärbt: Die nicht vorbehandelten Hefezellen sind stark violett gefärbt, mit Ausnahme von helleren zentralen Teilen, die wahrscheinlich den im Alkohol gelösten Lipoiden entsprechen dürften; dagegen erscheinen die mit Salzsäure gekochten Hefezellen schwach rot gefärbt (Fig. 4 a, b, c);

b) mit Karbol-Brillantgrün heiß gefärbt (3 Min.), in 5proz. Essigsäure entfärbt, 2 Min. mit Tannin gebeizt und mit Safranin 1 Min. lang nachgefärbt: die normalen Hefezellen haben ein rotes Ektoplasma und einen schwach gefärbten Leib, die Sporen sind grün und haben eine rosa gefärbte Kapsel; dagegen sind die mit 2proz. Salzsäure gekochten Zellen in toto rot gefärbt, ohne die geringste Spur einer Ektoplasmadifferenzierung erkennen zu lassen, während die mit 5proz. Salzsäure vorbehandelte Hefe fast ungefärbt erscheint (Fig. 4 a', b', c').

Weitere Versuche haben nun gelehrt, daß eine viel kürzere Behandlung mit verdünnter heißer Salzsäure schon ausreicht, um die Hefe durch nachherige Alkoholextraktion gramnegativ zu machen, wie folgender Versuch zeigt:

10. Versuch. 10 g Hefe werden 20 Min. mit verdünnter 2proz. Salzsäure gekocht und dann filtriert. Vom Sediment werden Ausstriche hergestellt, hitzefixiert und gründlich mit Wasser abgespült. Nach Gram gefärbt, erscheinen die Hefezellen noch gramfest, wenn auch schwächer als normale Hefe. Nach 24stünd. Behandlung mit Alkohol absolutus zeigen jedoch die Ausstriche, nach Gram gefärbt[1]), mit verdünnter Ziehlscher Lösung nachgefärbt, einen völlig roten Zelleib. Nur der Nucleus, oft von einem hellen, ungefärbten Ring umgeben, ist noch violett gefärbt (Fig. 6).

Nach dieser Methode kann man in sehr bequemer Weise die grampositive Substanz im Großen isolieren, worüber ich später ausführlicher berichten werde.

Auf Grund ihrer Alkohollöslichkeit und ihrer Färbbarkeit mit basischen Farbstoffen (Gentianaviolett) ist die grampositive Substanz als saueres Lipoid charakterisiert.

Wie die oben erwähnten Versuche lehren, ist bei den grampositiven Bakterien das Ektoplasma deutlich gramfest. Bei der üblichen Färbung nach Gram färbt sich also das Ektoplasma mit und gibt die Farbe bei der Differenzierung mit Alkohol absolutus nicht ab. Damit stimmt die bekannte Tatsache überein, daß alle Bakterien, nach Gram gefärbt, größer erscheinen als bei anderen Färbemethoden (z. B. Methylenblau), und zwar, weil sich dabei, wie wir heute wissen, das Ektoplasma mitfärbt und nicht bloß der Zelleib, wie bei den anderen Färbemethoden. Die Versuche 7—9 zeigen ferner zur Evidenz, daß die Grampositivität der gramfesten Bakterien durch die Eigenschaften der Außenschicht des Ektoplasmas, bedingt ist.

Wenn man die ausgedehnte Literatur über die Gramsche Färbung überblickt (vergl. die ausgezeichnete Darstellung von Eisenberg, Die Gram-Differenzierung und ihr Mechanismus. [Hdb. d. mikrobiol. Techn. von Kraus-Uhlenhuth. Bd. I. S. 202]), so ist eine Arbeit von Benians besonders bemerkenswert. Nach diesem Autor sollen

1) Makroskopisch sind die Ausstriche nach der Herausnahme aus dem Alkohol völlig entfärbt.

Hefezellen, nachdem sie mechanisch zerrieben worden sind, ihre Gramfestigkeit verloren haben, bzw. soll nach Gram gefärbte Hefe nach dem Zerreiben die Farbe in Alkohol absolutus völlig abgeben. Diese Versuche von Benians stehen in vorzüglichem Einklang mit den Ergebnissen der oben geschilderten Versuche, nach denen die positive Färbung nach Gram an das Intaktsein des Ektoplasmas gebunden ist. Durch das mechanische Zerreiben wird selbstverständlich das Ektoplasma stark lädiert.

Da bislang eine Nachprüfung der Angaben von Benians meines Wissens nicht vorliegt, so schien es von großer Bedeutung, diesen Versuch zu wiederholen:

11. Versuch. 5 g Hefe werden im Exsikkator getrocknet. Die aus diesem Material hergestellten Objektträgerausstriche sind, nach Gram gefärbt, noch stark violett gefärbt. Hierauf wird eine kleine Menge dieser Hefe mit trockenem Seesand vermischt und im Achatmörser fein zerrieben, auf Objektträger ausgestrichen und nach Gram gefärbt: fast alle Zellen sind, soweit sie als solche noch zu erkennen sind, rot gefärbt, also gramnegativ.

Dieser Benianssche Versuch liefert eine vorzügliche Bestätigung der in dieser Arbeit aufgestellten Theorie, nach der die Gramsche Färbung durch das Ektoplasma der grampositiven Bakterien bedingt und an sein Intaktsein gebunden ist.

Ergebnisse.

1. Mittels der Tanninmethode (5proz. Tanninlösung) läßt sich bei gramnegativen Bakterien eine Außenschicht nicht darstellen. — 2. Diese Methode gestattet daher eine einfache Differenzierung und Darstellung beider Bakterienarten in 2 verschiedene Kontrastfarben. — 3. Das Ektoplasma der Grampositiven färbt sich nach der Gramschen Methode mit und gibt die Farbe bei der Alkoholdifferenzierung nicht ab: Das Ektoplasma der Grampositiven ist gramfest. — 4. Solange die Hefezelle grampositiv ist, läßt sich an ihnen nach der Tanninmethode ein Ektoplasma nachweisen. — 5. Sobald an den Hefezellen durch Einwirken starker chemischer Reagenzien die Außenschicht nicht mehr mit der Tanninmethode darstellbar ist, sind sie auch nicht mehr gramfest. — 6. Durch mechanisches Zerreiben läßt sich Hefe vollständig ihrer Gramfestigkeit berauben (Bestätigung des Versuches von Benians).

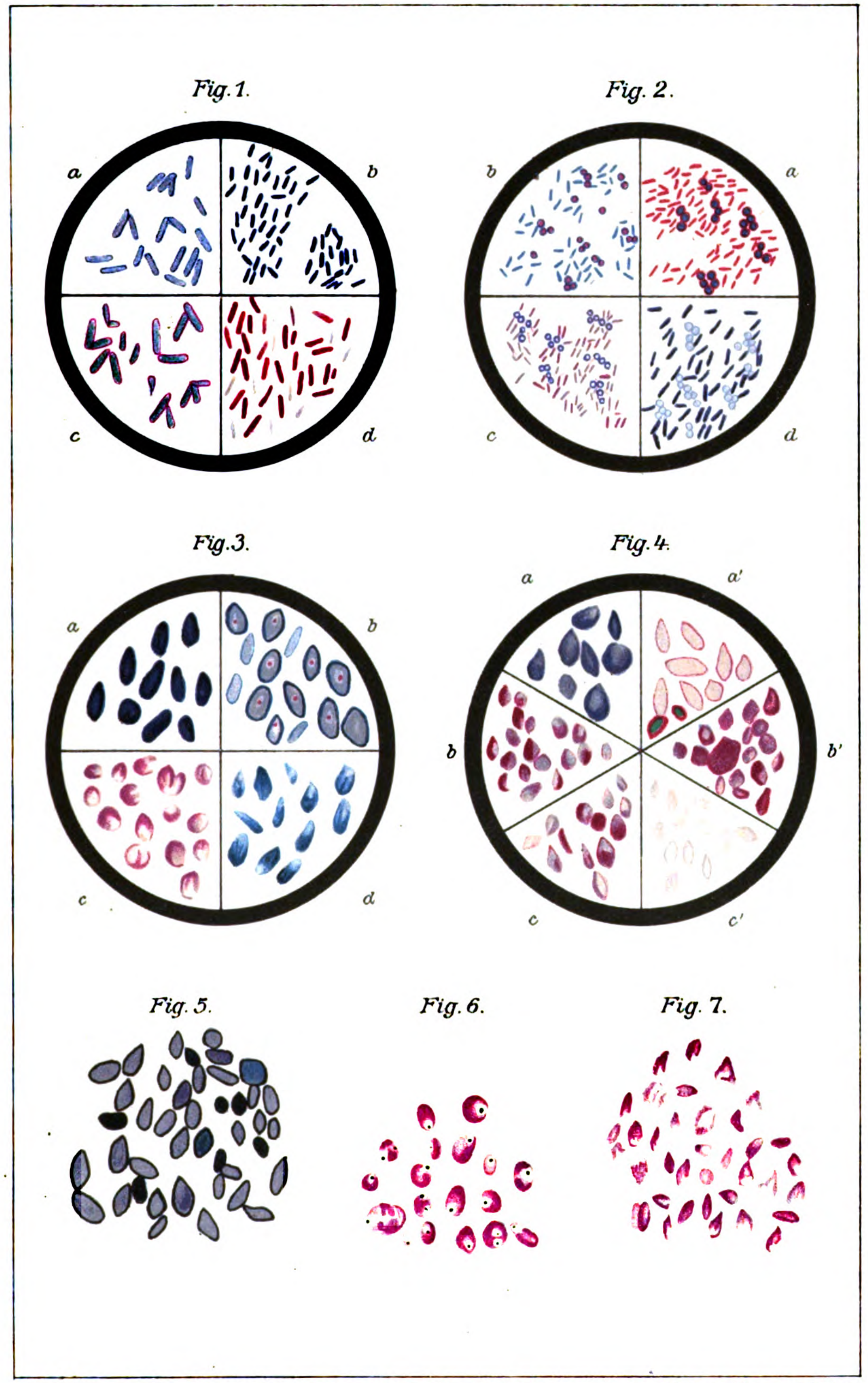
Die Gramfestigkeit der grampositiven Bakterien ist durch das Verhalten ihres Ektoplasmas bedingt und an sein Intaktsein gebunden.

Erläuterung der Abbildungen.

Die Abbildungen sind mit Okular 2 mm Oelimmersion Zeiss, Kompensationsokular 12, gezeichnet worden.

Fig. 1. a, b sind auf einem Objektträger gefärbt worden. Methode Tannin-Anilin-Gentianaviolett. Die Diphtheriestäbchen (a) zeigen nur eine Ektoplasmafärbung mit Andeutung der Teilungslinien. Die Typhusbakterien sind total und stark gefärbt (b).

Ebenso sind c, d auf einem Objektträger mit Brillantgrün-Tannin-Fuchsin gefärbt. Die Diphtheriestäbchen zeigen einen grünen Leib und leuchtend rotes Ektoplasma (c). Die Dysenteriestäbchen (d) sind total rot gefärbt. Vereinzelte Stäbchen nur schwach rot (tote Bakterien?).



Verlag von Gustav Fischer in Jena.   Lith. Anst. v. Johannes Arndt, Jena.

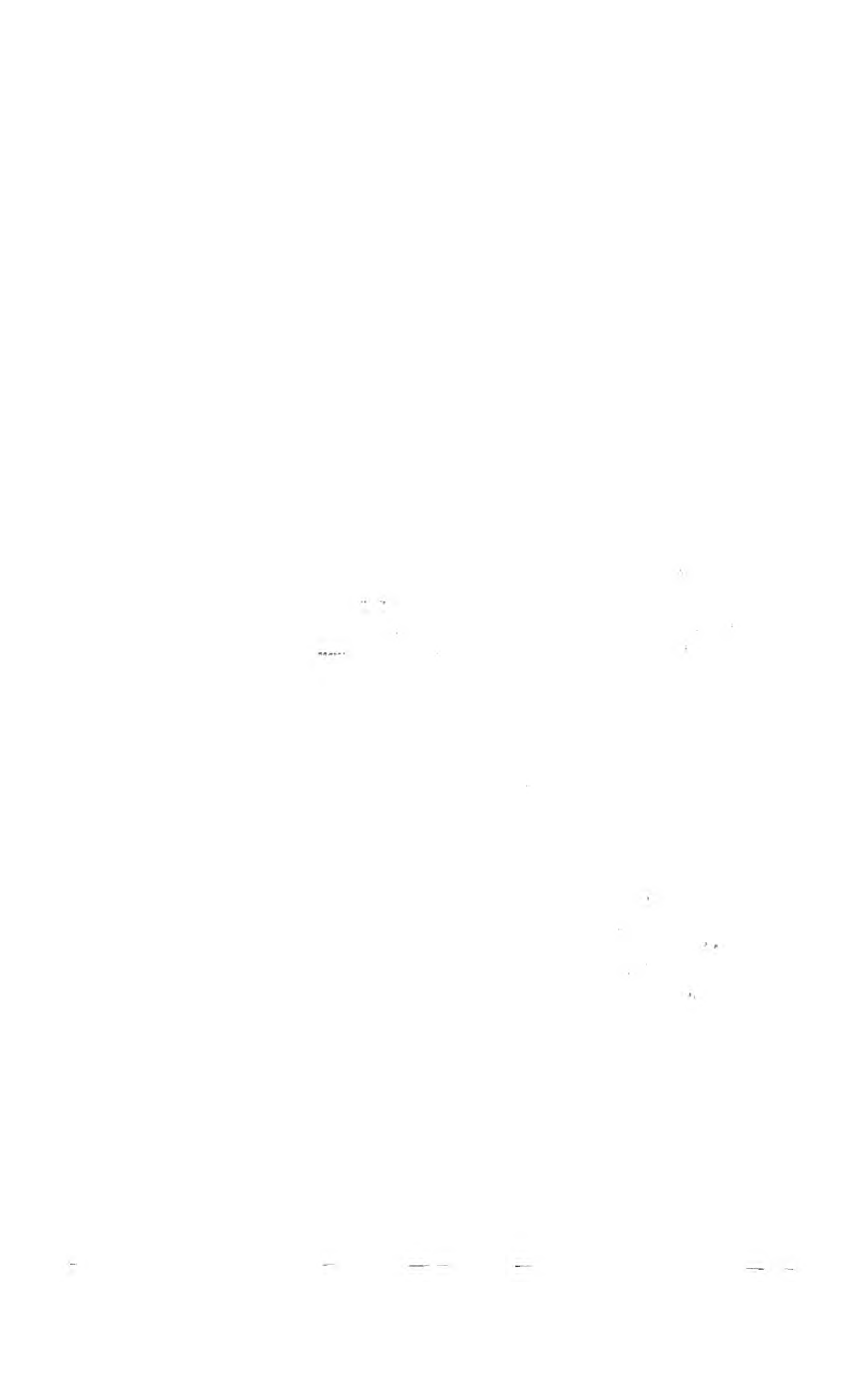


Fig. 2. Staphylokokken-Typhusausstriche.
a) Methode Methylenblau-Tannin-Karbolfuchsin: Kokken blau mit schwach angedeutetem rötlichem Ektoplasma. Stäbchen leuchtend rot.
b) Fuchsin-Tannin-Karbolmethylenblau: Kokken rot mit schwach bläulicher Ektoplasmahülle. Typhusstäbchen rein blau.
c) Tannin-Gram-Karbolfuchsin ($^1/_{10}$): Kokken zeigen eine blauviolette Hülle (gramfest), Stäbchen rot.
d) Tannin-modifizierte Gram-Färbung ohne Differenzierung: Stäbchen blauviolett, Kokken ungefärbt mit schwach angedeuteter Hüllenfärbung.

Fig. 3. Hefeausstriche, vorbehandelt.
a) Mit Schweizers Reagens: Grams Färbung, Zellen sind noch gramfest.
b) Ebenso vorbehandelt. Färbung Fuchsin-Essigsäure-Tannin-Methylenblau: roter Nucleolus mit hellerem Hof, blaues Ektoplasma.
c) Mit konz. HCl vorbehandelt, Grams-Färbung: Die Hefezellen sind rot, gramnegativ.
d) Ebenso vorbehandelt. Färbung: Tannin-Methylenblau: Hefezellen total blau, kein Ektoplasma.

Fig. 4. Hefe. a, a' normale Hefe, b, b' mit 2proz. HCl 2 Std. gekocht, c, c' mit 5proc. HCl 2 Std. gekocht, a, b, c und a', b', c' je auf einem Objektträger simultan gefärbt.
a, b, c) Grams Färbung, Ziehlsche Lösung $^1/_{10}$:
a) Zellen violett, also grampositiv mit einzelnen helleren Stellen,
b) gramnegativ,
c) gramnegativ.
a', b', c') Färbung: Brillantgrün-Essigsäure-Tannin-Safranin.
a') Rotes Ektoplasma mit hellem Leib, Sporen grün mit roter Membran,
b') Zellen total rot, kein Ektoplasma nachweisbar,
c') Zellen fast ungefärbt.

Fig. 5. Normale Hefezellen. Färbung: Tannin-Gram. Alkoholdifferenzierung ohne Nachfärbung. Ektoplasma dunkelblau bis schwarz-violett. Leib schwach gefärbt.

Fig. 6. Hefe mit 2proz. HCl 20 Min. gekocht. Alkoholextraktion (24 Std.). Färbung: Gram-Ziehlsche Lösung ($^1/_{10}$): Nucleolus violett (gramfest) mit hellem, ungefärbtem Hof. Leib rot, gramnegativ.

Fig. 7. Hefe im Achatmörser zerrieben. Färbung: Gram-Ziehlsche Lösung ($^1/_{10}$): Die Zellen sind gramnegativ (rot).

Ueber die praktische Leistungsfähigkeit einiger neuerer Methoden zur Anreicherung von Typhusbakterien im Stuhl.

[Aus dem Hygienischen Institut der Universität Rostock (Direktor: Prof. Dr. v. Wasielewski).]

Von **Theobald Sütterlin** und **Hans Demme.**

Das in letzter Zeit an verschiedenen Stellen Deutschlands wieder gehäufte Auftreten von Typhusepidemien gibt Veranlassung, das leidige Thema der bakteriologischen Typhusdiagnose wieder anzuschneiden, und auch wir hier in Rostock hatten mehr denn je Grund, festzustellen, ob neuere Verfahren ohne wesentlich höheren Aufwand an Untersuchungsgerät, Chemikalien und Arbeitskraft doch eine größere Sicherheit zur Auffindung von Typhuskeimen in den zur Untersuchung eingesandten Stuhlproben bieten, als das bisher bei uns geübte Neißer-Kochsalzverfahren. Dies um so mehr, als wir aus äußeren Gründen unsere Stühle nicht, wie Neißer angibt, über Nacht stehen lassen, sondern sie stets unmittelbar nach Herstellung der Aufschwemmung ausstreichen. Zu diesem Zwecke haben wir die uns reichlich zur Ver-

fügung stehenden Stuhleinsendungen fortlaufend etwa 3/4 Jahre hindurch dazu benutzt, Vergleichsuntersuchungen zwischen den verschiedenen, in den letzten Jahren angegebenen Typhusanreicherungs- oder Elektivverfahren anzustellen und sie auf ihre praktische Brauchbarkeit zu prüfen. Namentlich dieser Punkt scheint häufig bei Angabe solcher Verfahren nicht genügend berücksichtigt zu werden: nicht darauf kommt es unseres Erachtens an, aus einem Stuhl durch eingehende Untersuchungen und dabei meist recht umständliche Behandlung auch noch das letzte etwa vorhandene Typhusbakterium sicher herauszuzüchten, sondern darauf, bei Masseneinsendungen, wie sie Epidemiezeiten bringen, mit einfachen, aber sicheren Mitteln ein Ueberwuchern der etwa vorhandenen Typhusbakterien durch Coli- und andere Begleitbakterien auf den Platten zu verhindern. Selbstverständlich muß es unser Ehrgeiz immer sein, eine klinische Typhusdiagnose auch bakteriologisch zu bestätigen; aber im Vordergrunde soll unser Bestreben stehen, gesunde Bazillenträger ausfindig zu machen; denn gerade sie sind meist die Ursachen der fortschreitenden Epidemie, deren Verhütung hauptsächlich in die Tätigkeit des Seuchenhygienikers fällt.

Wir sind nun bei unserer Arbeit so vorgegangen, daß wir die uns eingesandten Stuhlproben, welche vorher nach dem oben angegebenen Neißer-Verfahren verarbeitet wurden, gleichzeitig dazu benutzten, um 1 oder höchstens 2 andere Verfahren auszuprobieren. Wir haben also grundsätzlich nur echte Typhusstühle verwandt, und zu künstlich infizierten oder gar reinen Bakterienaufschwemmungen nur gegriffen, um die Brauchbarkeit eines Verfahrens überhaupt zu prüfen, oder uns in seine Technik einzuarbeiten.

Die angegebenen Untersuchungsverfahren zerfallen in 2 große Gruppen: einmal in die, welche durch rein mechanische Maßnahmen ein Herausholen etwa vorhandener Typhuskeime aus dem Stuhl oder seiner Aufschwemmung zu erreichen suchen, und in solche, die sich zu diesem Zwecke des Zusatzes von Chemikalien zu den Nährböden bedienen, die entweder das Typhuswachstum befördern, oder das der Begleitbakterien unterdrücken sollen.

Zu der 1. Gruppe gehört als das einfachste das Neißersche Kochsalzverfahren, mit dessen Ergebnissen wir namentlich gegenüber dem früher hier geübten Verfahren des unmittelbaren Ausstriches im allgemeinen sehr zufrieden waren.

Ebenso fallen in diese Gruppe die von Friedberger angegebene Filtrierpapiersteigemethode, das von Kuhn und Heck angegebene Tierkohle- und Bolus alba-Verfahren und das von Dudgeon und Wordley eingeführte und von Bering auch in Deutschland, allerdings mit Einschränkungen, empfohlene Ausstrichverfahren auf Ziegel- oder Tonplatten. Die Ueberlegenheit des Bolusverfahrens konnte nach 1920 im hiesigen Institut von Reiter und Meyer angestellten Versuchen nicht bestätigt werden, und auch die Angaben anderer Nachprüfer sind so wechselnd, namentlich auch in ihren theoretischen Anschauungen — der eine suchte Typhusbakterien im Filtrat, der andere im Filterrückstand —, daß dem Verfahren in seiner bisherigen Form sicher keine praktische Brauchbarkeit zugesprochen werden kann.

Das Ziegelausstrichverfahren wird von Bering wegen seiner Umständlichkeit für Massenuntersuchungen abgelehnt. Wir können uns seinen Bedenken nur anschließen, wobei wir noch die erhöhte Infek-

tionsgefahr für den Untersucher hervorheben möchten, der er beim Abkratzen des angetrockneten Stuhles ganz entschieden ausgesetzt ist.

Mit der Filtrierpapiersteigemethode hatten wir verhältnismäßig befriedigende Erfolge, doch können wir die Angaben Friedbergers, der in der gramnegativen Eigenschaft der Typhusbakterien ihr durch die „Adsorbabilität" bedingtes besseres Steigvermögen sucht, nicht bestätigen, da wir öfters auch grampositive Kokken oberhalb der Typhuskeime fanden. Auch in seiner Handhabung dürfte das Verfahren zu umständlich sein, wenn ihm auch zum Vorteil gereicht, daß es jederzeit ohne große Vorbereitungen herangezogen werden kann. Eine Ueberlegenheit gegenüber dem verkürzten Neißer-Verfahren konnten wir niemals feststellen, wie wir überhaupt glauben, daß das wirksame Prinzip in der dem Eintauchen der Filtrierpapierstreifen vorangehenden Kochsalzanreicherung liegt.

Der Ersatz der Filtrierpapierstreifen durch Glaskapillaren, wie sie ursprünglich von Ali-Cohen zur Typhusdiagnose benutzt wurde, und die wir teils leer, teils mit den verschiedensten Anreicherungs- oder Elektivflüssigkeiten gefüllt hatten, zeigte keine praktisch verwertbaren Ergebnisse. Auch das Tränken der Filtrierpapierstreifen mit solchen Flüssigkeiten hatte keinen besseren Erfolg.

Von chemischen Verfahren ist das Pentan, das auch die wirksame Substanz des Petroläthers ist, von Wernicke eingeführt worden. Seine Ueberlegenheit gegenüber dem direkten Ausstrichverfahren besteht aber höchstens darin, daß Coli durch die Pentandämpfe in seiner Entwicklung stark gehemmt wird, wogegen ein Ueberwuchern der Typhuskeime durch etwa begleitende Kokkenarten nicht verhindert werden kann. Das Verfahren ist, ebenso wie auch die elektive Wirkung des Coffeins, dessen Verwendung von Roth empfohlen wurde, fast nur mit Bakterienaufschwemmungen oder künstlich infizierten Stühlen geprüft worden. Nachprüfer bezweifeln jedenfalls die Ueberlegenheit dieser Methoden.

Von Guth wurde das Natrium selenosum als Zusatz zu Platten oder Bouillon angegeben. Wir haben mit Selenbouillon zahlreiche Versager gegenüber dem verkürzten Neißer-Verfahren zu verzeichnen gehabt und können daher Guths Ergebnisse nicht bestätigen. Wir glauben überhaupt, daß alle flüssigen Anreicherungsmittel nur deshalb in den Händen ihrer Entdecker Mehrerfolge aufweisen, weil sie mit dem direkten Ausstrich eines kleinen Stuhlpartikelchens auf 1 oder 2 Spezialplatten verglichen werden und nicht mit dem Ausstreichen eines Tropfens der Stuhlaufschwemmung. So sind letzten Endes die guten Ergebnisse zum größten Teil auf das bei jeder flüssigen Anreicherung notwendige „Neißer-Prinzip" zurückzuführen.

Wir haben zuletzt auch noch das am meisten gebräuchliche Malachitgrün in Gestalt von Agarplatten zum Vergleich herangezogen, nachdem wir sowohl die H-Ionen- wie die Malachitgrünkonzentration genau biologisch mit einem Typhus- und einem Coli-Stamm austitriert hatten, und haben, wenn die Vorschrift von Mayer genau beobachtet wurde, der vor einem Schwenken der mit 8—10 ccm physiol. Kochsalzlösung vorsichtig übergossenen Platten warnt, nicht nur 12 Proz. Mehrerfolge aufzuweisen gehabt, sondern auch festgestellt, daß auf allen von der Malachitgrünplatte aus weiter geimpften typhuspositiven Spezialplatten die Typhuskolonien in viel reichlicherer Anzahl als auf den Platten des direkten Neißer-Ausstriches vorhanden waren. Das Verfahren hat allerdings den Nachteil, daß die Malachitgrün-

konzentration jeder neuen Agarserie jedesmal wieder genau austitriert werden muß, daß also die Platten nicht jederzeit vorhanden sind, wenn nicht ständig damit gearbeitet wird. Ein 2. Nachteil, der der Diagnoseverzögerung um einen Tag, der — nebenbei gesagt — auch allen anderen chemischen Anreicherungsmethoden anhaftet, spielt allerdings zumal bei der verschärften Typhusbekämpfung, wenn es sich um Schließung von Nahrungsmittelbetrieben o. ä. handelt, eine wesentliche Rolle; er muß aber in Kauf genommen werden, solange kein leistungsfähigeres Verfahren bekannt ist. Wenn man aber die Malachitgrünplatte als Schmierplatte benutzt und gleichzeitig noch auf Spezialplatten weiter ausstreicht, wobei sich uns neben Endo- und Drigalski-Nährböden auch der Dreifarbennährboden nach Gaßner sehr bewährte, so kann ein großer Teil der positiven Ergebnisse bereits 1 Tag früher hinausgehen. Auch die Mehrkosten und die Mehrarbeit sind gering. Die von Scheer empfohlene Methode, die Malachitgrünabschwemmung vor der Weiterverarbeitung zu zentrifugieren, konnten wir mangels einer geeigneten Zentrifuge nicht nachprüfen. Sie scheint uns aber recht umständlich und für das Personal sicher nicht ungefährlich.

Interessant ist vielleicht die Feststellung, daß kaum ein Erfinder einer neuen Anreicherungsmethode angibt, daß diese in seinem Institut längere Zeit zur Untersuchung der eingegangenen Stuhlproben angewandt wurde. Die einzige Ausnahmen bilden Neißer mit seiner Kochsalzaufschwemmung, Kuhn mit dem Bolusverfahren und die Malachitgrünanreicherung. Bei den meisten anderen, auch den hier nicht näher besprochenen Methoden, handelt es sich um solche, die im Einzelexperiment sehr schöne Resultate gaben, in der bakteriologischen Praxis aber kaum brauchbar sind; zum Teil sind sie sogar in der Hauptsache nur mit Bakterienaufschwemmungen oder künstlich infizierten Stühlen versucht worden, woraus sich natürlich noch keine endgültigen Schlüsse ziehen lassen. Denn die biologischen Eigenschaften eines Typhusstammes erfahren im Laboratorium im Laufe der Zeit sicher eine gewisse Umwandlung. Jedenfalls sind für derartige Versuche immer möglichst frisch isolierte Bakterienstämme zu verwenden, wenn keine echten Typhusstühle zur Verfügung stehen.

Zum Schluß möchten wir betonen, daß wir uns der Ansicht von Neißer anschließen, der bei der bakteriologischen Typhusdiagnose großen Wert auf den „persönlichen Faktor“ legt. Auch nach unseren Erfahrungen kommt es weit weniger auf die gewählte Methode an als auf die richtige Durchführung dieser. Ein Verfahren, das in der Hand des Ungeübten versagt, gibt in der Hand des Geübten ausgezeichnete Resultate. Bering meint sogar, daß alle bisherigen Anreicherungsmethoden mehr oder weniger brauchbar sind, ohne aber eine wesentliche Verbesserung zu bedeuten. Wenn wir auch dieses resignierte Urteil nicht ganz unterschreiben wollen, so geben wir doch zu, daß die Methode noch nicht gefunden ist. Die außerordentliche Wichtigkeit der bakteriologischen Typhusdiagnose fordert daher unbedingt ein weiteres Studium der Biologie des Typhusbakterium in der Hoffnung, durch genaue Kenntnis seines biologischen Verhaltens endlich zu einem Anreicherungsverfahren zu kommen, welches den eingangs erwähnten Forderungen entspricht.

(Die ausführlichen Versuchsprotokolle und das Literaturverzeichnis finden sich in der Dissertation von Demme, Rostock 1924.)

Zur Pathogenese der Cholera[1]).

[Aus der Abteilung für Tropenkrankheiten des staatlichen Bakteriologischen Instituts in Baku, Aserbeidschan (Abteilungsvorsteher: Dozent P. Sdrodowski).]

Von **P. Sdrodowski** und **E. Brenn.**

Im Zusammenhang mit den Arbeiten Sanarellis über die Pathogenese der Cholera, die in 9 Mitteilungen in den „Ann. de l'Inst. Pasteur" 1919—1924 veröffentlicht wurden, sind von uns experimentelle Untersuchungen an Kaninchen angestellt worden, vorwiegend zum Zwecke der genauen Erforschung der „algiden Periode", und zwar von dem Gesichtspunkt der experimentellen Ergebnisse Sanarellis ausgehend, die seine beiden letzten Arbeiten vom September 1923 und Januar 1924 enthalten.

Die Ergebnisse unserer Beobachtungen, die in verschiedenen Versuchsreihen an 90 Kaninchen gewonnen wurden, können folgendermaßen zusammengefaßt werden:

1. Uebereinstimmend mit der Auffassung Sanarellis über den Enterotropismus der Choleravibrionen und ihrer Eiweißstoffe, ergab sich an unserem Material, daß in der Tat die parenterale Einverleibung von Aufschwemmungen lebender Choleravibrionen (intravenös oder intraperitoneal) bei Kaninchen eine Darmaffektion verschiedener Intensität zur Folge hat. Auch abgetötete Cholerakulturen (1 Std. bei 60 ^{0}) haben bei Kaninchen enterotrope Wirkung, die sich durch regelmäßig auftretende Enteritiden dokumentiert, wenn eine genügende Menge Choleravakzin (1000—2000 Millionen) subkutan eingeführt wurde.

2. Die infolge der parenteralen Einführung lebender oder toter Cholerakulturen bei Kaninchen auftretenden Enteritiden sind in ihrem Verlaufe nicht charakteristisch und der menschlichen Cholera mit ihrer charakteristischen „algiden Periode", einem Symptom, das bei Choleraenteritiden des Kaninchens stets fehlt, nicht gleichzustellen.

3. Die Angabe Sanarellis über die Eigenschaft der Choleravibrionen und deren spezifischer Eiweißstoffe, im Kaninchenorganismus Bacterium coli und andere Darmbakterien zu aktivieren (Microb. de sortie), wurden experimentell bestätigt: Nach parenteraler Zufuhr von lebenden und abgetöteten Choleravibrionen in nicht tödlichen Dosen können, selbst bei akutem Verlauf, Coli-Bazillen auftreten, die zum Tode führen.

4. Die Auffassung Sanarellis über die Aktivierung der Coli-Bazillen im Tierkörper im Verlaufe einer künstlichen parenteralen Cholerainfektion oder bei parenteraler Einführung der spezifischen Eiweißstoffe muß noch durch Hinzufügung einer wesentlichen Tatsache erweitert werden: Die Mobilisierung der Coli-Bazillen im Kaninchendarm tritt verhältnismäßig häufig (in 20—25 Proz.) bei parenteraler Einführung von abgetöteten Choleravibrionen durch die Magensonde auf, falls diese Einführung mehrfach vorgenommen wird (bei genügenden Dosen und im Hungerzustand), wobei trotzdem auch bei einmaliger

1) Nach einem Vortrag, gehalten auf dem VIII. allrussischen Bakteriologenkongreß in Petersburg, Mai 1924.

Vibrionenzufuhr ausnahmsweise eine Colibazillose auftreten kann (18 Versuche).

5. Nach Angaben Sanarellis ergibt eine intravenöse Injektion von Choleravibrionen in nicht tödlicher Dosis mit nachfolgender intravenöser Verabfolgung einer indifferenten Dosis von Coli-Toxin (Filtrat einer Coli-Bouillonkultur) bei Kaninchen ein tödliches Syndrom, das in seiner klinischen, bakteriologischen und pathologisch-anatomischen Bedeutung der „algiden Periode“ der menschlichen Cholera entspricht.

Kreuzversuche haben die Möglichkeit erwiesen, nach der Sanarelli-Methode dieses Syndrom hervorzurufen, das bei unseren Kaninchen in 60 Prozent der Fälle auftrat (13 Versuche).

6. Nach unserer Beobachtung verläuft das nach Sanarelli hervorgerufene „algide Syndrom“ in akuten Fällen mit zunehmender Hypothermie, plötzlichen Krampfanfällen, Asphyxie und Tod des Versuchstieres, wobei die Anfälle in akuten Fällen bald nach der Injektion des Coli-Toxins auftreten (nach 30—40 Min. oder in den ersten darauf folgenden Stunden), oder der Tod tritt spät ein, im Verlauf von 1—2 Tagen.

7. Die pathologisch-anatomischen Veränderungen, welche bei den zugrunde gegangenen Versuchstieren festgestellt wurden, waren folgende: bald nach dem Tode auftretende und starke Fäulnis, Trockenheit oder geringe Exsudation in der Bauchhöhle oder starke Exsudatbildungen mit Blutungen (nach Sanarelli soll die Trockenheit der serösen Häute charakteristisch sein). Injektion der Bauchhöhlengefäße besonders im Bereich des Darmes, zuweilen Extravasate am Rektum. Enteritis mit gewöhnlich starker, zuweilen totaler Desquamation des Schleimhautepithels und Zerstörung der Drüsen. In schweren Fällen Hämorrhagien im Dickdarm mit diphtherischen Geschwüren im Blinddarm (1 Fall), in der Mehrzahl der Fälle starke Schädigung der Niere (besonders ausgeprägt im Falle eines nicht zu zeitigen Todes des Versuchstieres), mit Hämorrhagien in der Rindensubstanz, Degeneration der Epithelien der gewundenen Harnkanälchen, Pyknose und Herdnekrose an den Epithelien der gewundenen Harnkanälchen (buntes Aussehen der Nierenoberfläche infolge charakteristischer Anordnung der hämorrhagischen und nekrotischen Herde), auffallende Kontraktion der Blase, Eiweiß im Harn und Desquamation des Schleimhautepithels der Blase.

Außer den angeführten Veränderungen sind zu erwähnen: häufige subepikardiale Blutungen, Infarkte und Hämorrhagien der Lungen, ausnahmsweise Exsudat im Perikard und den Pleuraräumen (bei gleichzeitigem reichlichen Exsudat im Bauchraum). Die von uns beobachteten pathologisch-anatomischen Beobachtungen entsprechen den von Sanarelli festgestellten, mit Ausnahme der nicht regelmäßig vorhandenen Trockenheit der serösen Häute, die nach diesem Verfasser ein besonders charakteristisches Merkmal bilden sollen; die Veränderungen im Darm, den Nieren und der Blase stimmen mit den Erscheinungen der nach dem Vorschlag von Sanarelli so genannten Epithalaxie überein.

8. Bakteriologisch ließen sich bei Auftreten des nach der Sanarelli-Methode hervorgerufenen „algiden Syndroms“ in unseren Versuchen Reinkulturen von Choleravibrionen aus dem Dünndarm züchten und auch im Blute Vibrionen nachweisen (letzteres findet seine Er-

klärung im jugendlichen Alter der Kaninchen, die besonders zur „Vibrionämie" neigen); bei sehr protrahiertem Verlauf (Tod nach 48 Std.) beobachteten wir eine Coli-Bazillose mit Reinkultur von Bact. coli aus dem Dünndarm und Fehlen der Choleravibrionen.

9. Die Versuche, das „algide Syndrom" statt durch Injektionen von Coli-Toxin durch Bouillon nach Filtration durch Kerzen, ferner durch 1proz. Stärkelösung und Bouillonfiltrat von Typhuskulturen hervorzurufen, schlugen fehl; bei Verwendung von Choleravakzine in genügender Dosis (bis 4000 Millionen) an Stelle des Coli-Toxins gingen dagegen die behandelten Kaninchen unter Erscheinungen einer allgemeinen Intoxikation mit zunehmendem Temperatursturz zugrunde.

10. Nach den Vorstellungen Sanarellis handelt es sich bei dem nach seiner Methode hervorgerufenen „algiden Syndrom" (Cholerainfektion und Coli-Toxin) um das Resultat des aktivierenden Einflusses der Cholerainfektion auf das Bacterium coli (richtiger auf die latenten Coli-Infektionsherde im lymphatischen Apparat des Darmes) mit einem darauf folgenden anaphylaktischen Schock unter den gegebenen Verhältnissen einer Sensibilisierung des Organismus gegenüber Coli-Bazillen und -Toxin (Aktivierung des Bact. coli unter dem Einfluß der Cholerainfektion — in der 1. Phase des Versuches; Auftreten des anaphylaktischen Schockes nach Einführung des Coli-Toxins — in der 2. Phase).

Die Erklärung der Pathogenese des „algiden Syndroms" aus dem Zusammenwirken der Choleravibrionen und der Coli-Bazillen fand in unseren Immunisierungsversuchen ihre experimentelle Bestätigung: mit Cholera- oder Coli-Vakzine vorbehandelte Kaninchen erwiesen sich gegen das Auftreten des „algiden Syndroms" als immun. Das Sanarelli-Phänomen blieb auch bei Verwendung einer 2—4fachen Dosis aus, bei gleichzeitigem positiven Ausfall bei Kontrolltieren (16 Versuche).

Anm. Nach den Angaben Sanarellis kommt es durch Choleravibrionen am häufigsten zu einer Aktivierung der Coli-Bazillen im Tierkörper; diese Aktivierung stellt ja auch den wesentlichsten Faktor beim Zustandekommen des „algiden Syndroms" dar. Eine Cholerainfektion ist jedoch imstande, auch andere Mikroorganismen, wie Staphylokokken, Streptokokken, B. proteus zu aktivieren, wobei das Auftreten des Phänomens auch bei Ersatz des Coli-Toxins durch Filtrate von Bouillonkulturen der genannten Bakterien bedingt sein kann. Eigene Beobachtungen darüber haben wir bisher nicht gemacht.

11. Unsere Versuche zeigten, daß das „algide Syndrom" in ähnlicher Weise, wie es nach Sanarelli bei mit Cholera vorbehandelten Tieren auftritt, auch ohne Cholerainfektion durch Einspritzung einer kleinen Dosis Coli-Bazillen und einer 24 Std. später erfolgenden, gleichfalls intravenösen Verabreichung einer indifferenten Dosis Coli-Toxin hervorzurufen ist. Diese Versuche zeigen deutlich, daß das „algide Syndrom" bei experimenteller Cholera der Kaninchen seiner Pathogenese nach nicht ein Cholera-, sondern ein Paracholeraphänomen ist (7 Versuche).

12. In bakteriologischer Beziehung ist das „algide Syndrom", das nach unserer Methode nur durch Coli-Toxin hervorgerufen werden konnte, dadurch charakterisiert, daß die inneren Organe der Versuchstiere fast völlig steril waren (in sehr akut verlaufenden Fällen) bei gleichzeitigem Vorhandensein von Bact. coli in Reinkultur im Dünn-

darm, oder aber es lag eine mehr oder minder ausgesprochene Coli-Bazillose vor (in den subakuten Fällen). Das pathologisch-anatomische Bild zeigte außer schnell auftretender Totenstarre Veränderungen an Dünndarm und Nieren, ebenso Hämorrhagien in den Lungen; in Fällen mit subakutem Verlauf zuweilen ausgesprochene Reaktion von seiten des lymphatischen Apparates (Peyersches Plaques, Sacculus, Appendix), offenbar im Zusammenhang mit dem Umstand, daß im lymphatischen Gewebe die parenteral eingeführten Coli-Bazillen in besonders großer Menge vorhanden sind, da auch außerdem infolge des Enterotropismus ein Uebertritt aus dem Blut in das Darmgewebe erfolgt.

13. Die Erzeugung des „algiden Syndroms" gelingt häufig, in ganz analoger Form wie nach der Sanarelli-Methode, durch einfach enterale Choleravakzination bei Kaninchen.

Unsere Versuche zeigten, daß nach der Einfuhr von steigenden Dosen durch Erhitzen abgetöteter Choleravibrionen, die im Hungerzustand (12—16 Std. Futterentziehung vor der Vakzinegabe und 3 bis 4 Std. nachher) mit Zwischenräumen von 5 Tagen nach einem allgemeinen Schema: 1. Gabe — 30 Mill. Keime; 2. — 60 Mill., 3. — 80—120 Mill. — gegeben wurden, die Kaninchen häufig schon nach wenigen Stunden nach einer der wiederholten Vakzinegaben zugrunde gehen, oder im Verlaufe von 1—2 Tagen, wobei es in akut verlaufenden Fällen zu Temperatursturz kommt und der Tod nach einem Anfall von heftigen Krampfzuckungen und unter Asphyxieerscheinungen eintritt (18 Versuche). Das beschriebene tödlich verlaufende Syndrom kann sich, wie unsere Versuche zeigten, auch bei Kaninchen entwickeln, die ohne Futterentziehung und nur mit sehr kleinen Dosen — bis 30 Milliarden — behandelt wurden (1 Beobachtung in einer Versuchsreihe von 5 Kaninchen).

Anm. Nach Angaben Sanarellis wird die enterale Einführung von Choleraproteinen (durch Sonde oder Darmfistel) in Form von mit Trypsin vorbehandelten Agarkulturen von Kaninchen vollkommen symptomlos vertragen, und zwar unabhängig von der Dosis des eingeführten Materials (z. B. bis 20 Kulturröhrchen auf einmal durch Fistel) und Dauer der Zufuhr (bis 30—40 Gaben zu 1—2 Kulturröhrchen im Verlaufe von 48 Std. bis 60 Tagen). Es ist möglich, daß die im Widerspruch zu unseren Versuchsergebnissen stehenden Beobachtungen Sanarellis dadurch zu erklären sind, daß S. Kulturen verwendet hat, die in vitro infolge des Verdauungsprozesses durch Trypsin verändert waren.

14. Die pathologisch-anatomischen Veränderungen der bei Behandlung mit Choleravakzine zugrunde gegangenen Tiere können folgendermaßen zusammengefaßt werden: schnell auftretende Totenstarre; Trockenhaut der serösen Häute oder geringe Exsudation im Abdomen, zuweilen mit Hämorrhagien; in der Regel erhebliche Hyperämie der abdominellen Gefäße; Enteritis verschiedenen Grades, zuweilen mit schweren Hämorrhagien und totaler Destruktion und Ablösung der Schleimhaut; makroskopisch sichtbare Veränderungen an den Nieren nicht vorhanden; Harnblase kontrahiert oder mit ganz geringen Harnmengen gefüllt; relativ häufig Hämorrhagien in Milz, Rektum und den Lungen.

Bei der bakteriologischen Untersuchung erwiesen sich in der Mehrzahl der akut verlaufenen Fälle innere Organe und Dünndarminhalt als steril; in langsamer verlaufenen Fällen konnten Coli-Bazillen fest-

gestellt werden; seltener zeigte sich auch in akuten Fällen eine Coli-Bazillose (Tod nach 2—3 Std.).

15. Die Pathogenese des beschriebenen, durch die Behandlung der Kaninchen mit Choleravakzine hervorgerufenen Syndroms ist offenbar mit dem bei der Sanarelli-Methode erzielten „algiden Syndrom" identisch und kann folgendermaßen erklärt werden: Die Darmvakzination verläuft unter intensiver Aufnahme der Choleraproteine durch die Darmwand, eine Tatsache, die in dem relativ hohen Agglutinationstiter ihren Ausdruck findet (bei 21 Kaninchen schwankte der Titer zwischen 1:300 bis 1:500 bis 1:2000, 1:3000). Die aufgenommenen Proteine aktivieren, ihren Eigenschaften entsprechend, das Bact. coli und dessen Toxin, was zur Sensibilisierung des Organismus gegenüber diesem Mikroorganismus und seinen Giftstoffen führt. Als Resultat der aufgetretenen Sensibilisierung werden durch die Wiederholung der Vakzination die Bedingungen für das Auftreten des Syndroms geschaffen, das offenbar anaphylaktischen Ursprung besitzt.

16. Die angeführte Erklärung der Pathogenese des beobachteten Syndroms vom Gesichtswinkel der Bedingtheit durch Coli-Bazillen, die unter dem Einfluß der Choleravakzination aktiviert worden sind, finden in folgenden Tatsachen ihre experimentelle Bestätigung:

a) Die Kaninchen zeigen nach einer wiederholten Enterovakzination eine große Empfindlichkeit gegenüber Coli-Toxin, dessen intravenöse Einverleibung schon in kleinsten Dosen bei den Versuchstieren ein tödlich verlaufendes Syndrom vom Typus des Sanarelli-Phänomens hervorrufen kann. (Versuch der Sensibilisierung gegenüber Coli-Bazillen.)

b) In protrahierten Fällen kann man bei den Versuchstieren häufig eine Coli-Bazillose nachweisen (Versuch der Aktivierung der Coli-Bazillen).

c) Bei Kaninchen, die auf subkutanem Wege mit Bact. coli vakziniert worden waren, ließ sich bei nachfolgender Cholera-Enterovakzination das Syndrom nicht hervorrufen, während nicht vorbehandelte Kontrolltiere unter sonst gleichen Bedingungen zugrunde gingen (10 Versuche). Mit Coli vorbehandelte Kaninchen erwiesen sich auch als resistent gegen intravenöse Zufuhr von Coli-Toxin, im Gegensatz zu der ausgesprochenen Empfindlichkeit der Kontrolltiere.

Anm. Das nach unserer Methode (Sensibilisierung durch Choleraenterovakzination) hervorgerufene Syndrom unterscheidet sich von dem nach der Sanarelli-Methode erzeugten durch geringere Schädigung der Nieren, was aber die Identifizierung der beiden Vorgänge ihrer übereinstimmenden Pathogenese nach nicht verhindern kann. Die pathologisch-anatomischen Veränderungen variieren auch bei der Sanarelli-Methode in bezug auf Intensität der Erscheinungen (zuweilen völliges Fehlen makroskopisch sichtbarer Veränderungen an den Nieren bei akutem Verlauf). Die Häufigkeit der Nierenschädigung bei Ausführung der Sanarelli-Methode erklärt sich vermutlich aus der größeren Konstanz der Versuchsbedingungen (intravenöse Verabreichung der Choleravibrionen und des Coli-Toxins).

17. Nach Anschauungen Sanarellis ist das nach seiner Methode hervorgerufene „algide Syndrom" eine Anaphylaxie, die als Resultat der Sensibilisierung des Organismus gegenüber den Coli-Bazillen und anderen Mikroorganismen, infolge Aktivierung der letzteren durch die Cholerainfektion, auftritt. Für die anaphylaktische Natur des Vor-

ganges spricht nach Sanarelli besonders das Auftreten von zunehmender Hypothermie, Krampfanfällen und Asphyxie, ferner Sinken des Blutdruckes und Leukopenie mit darauffolgender Leukozytose; schließlich die Erweiterung der abdominellen Gefäße u. a. Die unter dem Begriff Epitalaxie zusammengefaßten pathologisch-anatomischen Veränderungen werden von Sanarelli ebenfalls als das Ergebnis einer anaphylaktischen Perturbation der Zellen aufgefaßt. Die angeführten Anschauungen über die anaphylaktische Natur des Syndroms widersprechen unseren Beobachtungen nicht, sie widersprechen auch den theoretischen Vorstellungen über das Wesen der Anaphylaxie nicht, als einem bestimmten Vorgang, der unter verschiedenartigen Bedingungen infolge einer Störung des inneren (kolloidalen) Gleichgewichtes auftritt.

Anm. Ein tödlicher anaphylaktischer Anfall kann, nach Sanarelli, zuweilen bei Kaninchen nach Einführung an sich nicht tödlicher Dosen von Cholerakulturen auftreten, als Resultat einer intensiven Aktivierung der latenten Herde von Coli-Bazillen und anderen Mikroorganismen. Auch wir konnten diese Tatsache bei Infektionen von Kaninchen mit geringen Dosen beobachten.

18. Das bei Tieren hervorgerufene „algide Syndrom" hält Sanarelli seinem Wesen und seiner Pathogenese nach für identisch mit dem echten Cholerasyndrom beim Menschen. Wir wollen diese schwierige Frage der Identität des menschlichen „algiden Syndroms" mit dem nach der Sanarelli-Methode wie auch nach unserer Methode hervorgerufenen nicht endgültig entscheiden, wir glauben trotzdem, daß die im Experiment gemachte Beobachtung in der Gesamtheit der Erscheinungen in der Tat dem menschlichen Choleraalgid nahesteht und aus diesem Grunde eine volle objektive Würdigung verdient. Das Hervorrufen des Syndroms durch Sensibilisierung mit Proteinen durch den Darm allein nähert das Experiment den tatsächlichen Verhältnissen bei einem Auftreten des „Algids" beim Cholerakranken in noch weit höherem Maße. Wenn man sich auf den Standpunkt der Identität der Pathogenese des experimentellen Algids mit dem Choleraalgid des Menschen stellt, so muß man, wie unsere Versuche zeigen, logischerweise die experimentell erwiesene Berechtigung und Zweckmäßigkeit zugeben, auch das Bact. coli in die Vakzination gegen Cholera mit einzuschließen. Unsere Beobachtungen zeigen, daß Kaninchen, welche die Choleraenterovakzination gut überstanden hatten und volle Immunität gegenüber Cholera besaßen, trotzdem infolge Aktivierung der Coli-Bazillen nach der Einführung von Choleravibrionen in für diese Tiere durchaus indifferenten Dosen zugrunde gingen (2 von 9 Versuchen mit Enterovakzination).

Die Möglichkeit, das „algide Syndrom" durch Coli-Bazillen allein hervorzurufen, rückt diese Frage unseres Erachtens ins Gebiet der Pathologie der „algiden Zustände", die sich auch bei manchen Darmkrankheiten finden, die nicht durch Choleravibrionen bedingt sind (Cholera nostras, Gastroenteritis im Kindesalter), und deren Aetiologie offenbar mit den Coli-Bazillen eng verknüpft ist. Auch in bezug auf die Gruppe von Erkrankungen möchten wir auf Grund unserer Versuche auf die berechtigt erscheinende Prophylaxe mit Coli-Vakzinen hinweisen.

Untersuchungen über einen Erreger der ägyptischen Augenentzündung (Koch-Weeksches Bakterium) und seine Beziehungen zum Pfeifferschen Influenzabazillus.

III. Mitteilung: Weitere Untersuchungen über die Wirkung von Körperflüssigkeiten und Adsorbentien auf die wachstumsfördernden Stoffe der roten Blutkörperchen.

[Aus der Staatl. Bakteriologischen Untersuchungsanstalt Erlangen (Geh. Med.-Rat Prof. Dr. L. Heim, Prof. Dr. W. Weichardt),]

Von Priv.-Doz. Dr. **Maximilian Knorr**, Oberarzt der Anstalt.

Die Beobachtungen von Nestlinger und Davis über die wachstumshemmende Wirkung von Serum und Aszitesflüssigkeit auf hämophile Keime wurden von Terada sowie von mir ergänzt und erweitert. Terada hat die Ursache der Wachstumshemmung einem Ferment zugeschrieben, das dem Globulinanteil des Pferdeserums anhaftet. Er vermutete, daß der Fermentgehalt des Serums nach der Art und dem Zustand des Tieres Schwankungen unterworfen sein kann.

Terada hatte damals noch nicht erkannt, daß in den Blutkörperchen 2 wachstumsfördernde Stoffe vorhanden sind, von denen nur einer ausgeschlossen sein braucht, um die Wachstumshemmung in Erscheinung treten zu lassen. Thjötta und Avery haben die beiden Stoffe der roten Blutkörperchen mit V und X bezeichnet.

Der V-Körper gehört nach Ansicht von Thjötta und Avery zu den Vitaminen. Er kommt außer in den roten Blutkörperchen in Pflanzen, Bakterien und Organen vor. Für seine organische Natur sprechen Versuche von Ghon und Preyss, Kalkbrenner, Olsen, Knorr und Gehlen. Der Körper diffundiert durch Gallerten und Membranen und ist gut wasser- und schlecht alkohollöslich (Agulhon und Legroux 1918, Davis 1921, Thjötta 1921, Legroux und Mesnard 1921). Er unterscheidet sich von dem X-Körper durch seine geringere Widerstandsfähigkeit gegen Erhitzung.

Der X-Körper widersteht selbst Temperaturen über 120° im Autoklaven. Er gibt die Benzidinreaktion noch in sehr hohen Verdünnungen und soll in einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-7}$ noch wirksam sein (Knorr u. Gehlen, Olsen; Thjötta und Avery). Wegen seiner Eigenschaften wird er von den Amerikanern als „katalytisches Agens", von Fildes als „Peroxydasekörper" bezeichnet. Die Abhängigkeit des Wachstums der Influenza- und Koch-Weeks-Bazillen von der Konzentration der V- und X-Körper habe ich in der zweiten Mitteilung besprochen. Nicht nur die hitzeunbeständige, den V-Körper zerstörende Eigenschaft des Serums, sondern auch ein Uebermaß der V- und X-Körper kann das Wachstum beeinträchtigen oder vermindern. Durch entsprechendes Kochen, wie z. B. bei Bereitung des Levinthal-Agars, wird dieses Ueberangebot auf die günstigste Konzentration zurückgeführt.

In der letzten Mitteilung habe ich im Abschnitt I über die Wirkung von Serum auf die wachstumsfördernden Stoffe der roten Blutkörperchen berichtet. Obwohl die Untersuchungen, die auf diesem Wege zur Klärung des Infektionsmechanismus bei Influenzaerkrankungen beitragen sollen, bisher noch nicht abgeschlossen werden konnten, haben sich doch verschiedene Tatsachen ergeben, die in den nachstehenden Versuchen niedergelegt sind.

1. Die Ausschaltung des V-Körpers durch Körperflüssigkeiten in Nährmitteln und ihre differentialdiagnostische Bedeutung.

Außer den Pfeifferschen Influenzabazillen benötigen nach den Feststellungen, die von mir (Febr. 1923) und unabhängig davon von Fildes (April 1923) gemacht worden sind, auch die Koch-Weeksschen Bazillen den V- und X-Körper. Schon früher fand Rivers (Nov. 1922) daß der Bacillus haemoglobinophilus canis (Friedberger) sich dadurch vom Influenzabazillus unterscheidet, daß er nur den hitzebeständigen Stoff der roten Blutkörperchen (= X-Körper) zum Wachstum benötigt. Fildes untersuchte außer den Koch-Weeksschen Bazillen auch noch die hämolytischen Influenzabazillen (Pritschett und Stillmann), die ihm der dänische Influenzaforscher Kristensen überlassen hatte. Auch die Angaben von Rivers über den Bacillus haemoglobinophilus canis bezog Fildes in seine Untersuchungen ein. Fildes kam zu gleichen Ergebnissen wie Rivers und ich; überdies fand er, daß die hämolytischen Influenzabazillen nur die hitzeunbeständigen Stoffe der roten Blutkörperchen benötigten, da sie unfähig seien, den „V-Körper zu synthetisieren“. Kristensen hat die Koch-Weeks-Stämme von Fildes auf die oben genannten Eigenschaften nachgeprüft und bestätigt unsere Angaben (briefliche Mitteilung).

Fildes hat mit Hilfe der Nährmittelansprüche an V (= filtrierter Hefeextrakt) und X (= Hämatin) folgende Ergebnisse gebucht:

	Hämatin	Hefe	Hämatin und Hefe
I.B. (Koch-Weeks)	0	0	+
B. haemogl. canis	+	0	+
Hämolytische Influenzastämme	0	+	+

Er kommt somit zur Einteilung:

	Blutpigmentfaktor (= X) ist zum Wachstum nötig:	V-Körper ist zum Wachstum nötig:
Bac. infl.	ja	ja
Bac. haemogl. canis	ja	nein
Hämolyt. Infl.-Stämme	nein	ja

Auch mit Hilfe der Serumwirkung ist die Differenzierung der Influenza-, Koch-Weeks- und Hämolyt. Influenzabazillen vom Bac. haemoglobinophilus canis möglich.

Zur Einführung in diese Versuche führe ich meine Ergebnisse mit Plasma, Serum und anderen Körperflüssigkeiten von Mensch und Tier kurz an:

Der den V-Körper beeinflussende Stoff scheint zwar in allen Körperflüssigkeiten der Menschen vorhanden zu sein, tritt aber meist nur nach längerer Einwirkung hoher Konzentrationen in Erscheinung. Ausnahmen, wo auch in höheren Verdünnungen nach kürzerer Einwirkung Wachstumshemmung zu beobachten war, sind nicht häufig.

Es kam ferner vor, daß die Aszitesflüssigkeit des gleichen Kranken im Gegensatz zu seinem Blutserum den V-Körper unwirksam machte.

Die Menge des zugesetzten Serums (Davis) und die Zeit der Serumeinwirkung bedingen ganz allgemein den Grad der Wachstumshemmung.

Die wenigen Versuche, die mit Taubenserum glückten, ergaben ebenso wie die mit Katzenserum[1]) nie Hemmung, auch nicht nach 72stünd. Einwirkung auf den V-Körper.

Man kann Hammelserum, das neben Kaninchenserum fast stets auch in hohen Verdünnungen (bis 1:30) hemmt, wochenlang bei 37° trocknen, ohne daß es an Wirkung abnimmt.

1) Versuche mit Serum anderer Fleischfresser sind noch im Gange.

Die Reihenfolge der Sera nach der Regelmäßigkeit und Stärke der Ausschaltung des V-Körpers ist bis jetzt folgende: Hammel — Kaninchen — Meerschweinchen — Pferd — Ratte — Mensch — Taube — Katze.

1. Versuch[1]): 20 ccm dest. Wasser + 5 ccm Pferdeblut werden 18 Std. bei 37° belassen. Hierauf wird mit dieser Blutlösung in üblicher Weise Levinthal-Agar bereitet und mit Kochsalzaufschwemmungen folgender Stämme mit dem beigefügten Ergebnis beimpft.

I.-B.WL. ++++, K.W.B. 4810 ++++, B. c. +++, H.I.B. Astrup ++++

Da somit die Menge des Pferdeserums in 5 ccm Blut keine Wirkung auf den Ausfall des Wachstums hatte, wurde zu einer neuen Blutlösung, die wie im Versuch 1 bereitet war, Plasma des gleichen Pferdes zugegeben (Serum war nicht mehr vorhanden). Schon Terada bemerkt, daß Plasma und Serum gleiche Wirkung haben.

2. Versuch: 20 ccm dest. Wasser + 5 ccm Pferdeblut, dazu je 1 bzw. 3 ccm Plasma, 24stünd. Bebrütung, dann wie oben Levinthal-Agar bereitet, Beimpfung mit Kochsalzaufschwemmungen.

a) I.B.WL. ++, K.W.B. 4810 ++, H.I.B. Astrup ++++, B. c. +++
b) „ ±, „ 4810 ±, „ „ ++ , „ ++++
c) „ Kontrolle, gewöhnlicher Levinthal-Agar, alle Stämme ++++

3. Versuch: Zu gewöhnlichem Levinthal-Agar werden bei 45° in der Verd. 1:1,5 zwei Menschensera gegeben, und zwar eines 18jähr. bzw. 40jähr. gesunden Mannes. Die Platten wurden a) 24 und b) 48 Std. bei 37° bebrütet und dann mit Kochsalzaufschwemmungen beimpft. Da alle Versuche das gleiche Ergebnis hatten, führe ich nur ein Ergebnis an:

a) I.B.WL., 14 ±, K.W.B. 4810, 1048 ±, H.I.B. Astrup ±, B. c. ++
b) „ 14 —, „ 4810, 1048 —, „ „ ±, „ +++
c) Kontrolle, siehe Versuch 2, B. c. +++.

4. Versuch: Zur besseren Darstellung der den V-Körper ausschaltenden Serumwirkung wurde Levinthal-Agar mit nur 2,5proz. Hammelblut bereitet. Zu diesem Nährmittel wurden bei 45° gegeben:

a) Serum eines 20jährigen gesunden Mannes, Verd. 1:5. Die Platten werden 48 Std. bei 37° gehalten, dann mit Kochsalzaufschwemmung beimpft.

I.B.WL., 14 ++++, K.W.B. 4810, 1048 ++++, H.I.B. Astrup ++++, B. c. +++

b) Serum eines 30jährigen gesunden Mannes, Verd. 1:5.

c) Serum eines 47jährigen gesunden Mannes, Verd. 1:5.

In b) und c) das gleiche Ergebnis wie in a), B.c. ++ bzw. + (s. Anm.).

d) Meerschweinserum von je einem 370 und 450 g schweren Tier in Verd. 1:15. Im übrigen Versuchsanordnung wie bei 4a.

I.B.WL. 14 —, K.W.B. 4810, 1048 —, H.I.B. Astrup —, B.c. +++.

e) Hammelserum in Verd. 1:15, im übrigen siehe d).

f) Kaninchenserum siehe e).

In e) und f) das gleiche Ergebnis wie in d).

g) Kontrolle gewöhnlicher Levinthal-Agar, nur 2,5proz., entsprechend der Versuchsanordnung, alle Stämme ++++, B.c. +++.

5. Versuch: Zu 2,5proz. Levinthal-Agar wird bei 45° Kniegelenkpunktat eines Tuberkulösen in der Verd. 1:5 gegeben. Die Platten wurden a) 24, b) 48 Std. bebrütet und mit Kochsalzaufschwemmungen beimpft.

a) I.B.WL., 14 +, K.W.B 4810. 1048 +, H.I.B. Astrup ±, B. c. +++
b) „ 14 ±, „ 4810. 1048 ±, „ „ +, „ +++
c) Kontrolle gewöhnlicher 2,5proz. Levinthal-Agar, alle Stämme ++++.

---

1) Anmerkung: I.B. = Influenzabazillus. K.W.B. = Koch-Weeksscher Baz. B.c. = Bac. haemoglobinophilus canis. H.I.B. = Hämolytische Influenzabazillen. Die beiden letzteren Arten hat mir in liebenswürdiger Weise Herr Dr. Kristensen übersandt. Die H.I.B. waren bezeichnet: Stamm Astrup, H 18 und H 20.

++++ = üppiges, +++ = sehr gutes, ++ = gutes, + = schwaches ± = sehr schwaches, oft nur mikroskopisch sichtbares, — = kein Wachstum.

B.c. wächst auf Levinthal-Agar meist etwas schwächer als die anderen Arten. Auch die gleichen Aussaaten weisen bisweilen Unterschiede auf. Trotzdem kann ich mir damit allein das schwächere Wachstum in Versuchen mit Menschensera (z. B. Versuch 4c), die die anderen Arten im Wachstum nicht zu beeinträchtigen brauchen, nicht erklären.

6. Versuch: Levinthal-Brühe, mit 2,5proz. Hammelblut bereitet wird mit aktivem Hammelserum 1:10 versetzt, dann 10 Std. bei 37° gehalten, aufgekocht und durch Watte filtriert. Abfüllen in Röhrchen. Da in meiner letzten Mitteilung Abs. 3 die Technik der Beimpfung ausschlaggebend für das Ergebnis befunden wurde, wurden auch in diesem Versuche eine Reihe a) mit 1 mm Oese Kondenswasser, b) mit der gleichen Oese Kochsalzaufschwemmung beimpft. Nach 48stünd. Bebrütung werden die Röhrchen auf Levinthal-Agar ausgestrichen.

a) I.B.WL., 14 pos., K.W.B. 4810, 1048 pos., H.I.B. Astrup pos., B. c. pos.

b) „ 14 neg., „ 4810, 1048 neg., „ „ neg., „ „

c) Kontrolle Levinthal-Brühe wie oben, jedoch sofort nach Vermischung mit aktivem Hammelserum aufgekocht, filtriert und abgefüllt. In den Kontrollen zu a) wuchsen alle Stämme gut, nur Astrup blieb aus. Die Kontrollen zu b) gingen alle üppig an.

Es würde zu weit führen, noch weitere Versuche aufzuzählen. Das Ergebnis war immer das gleiche. Für das Gesamtergebnis unwichtige kleine Abweichungen in der Stärke des Wachstums kommen auch hier genau so vor wie bei dem Symbiosephänomen und anderen Versuchen, wo die Stärke des Wachstums als Indikator für die im Nährboden vorhandenen V- und X-Stoffe benützt wird (siehe die II. Mitteilung dies. Centralbl. S. 391, Weichardts Ergebn. Bd. 6. S. 362, und Diss. v. W. Gehlen, Erlangen 1923, ferner bei Fildes).

Hat somit eine Körperflüssigkeit die Eigenschaft, den V-Körper unwirksam zu machen, dann nimmt das Wachstum der Influenza-, Koch-Weeks- und der hämol. Influenzabazillen in gleicher Weise ab. Der Bac. haemoglobinophilus canis dagegen wächst unbehindert, da er zu seinem Wachstum des V-Körpers nicht bedarf.

2. Die Ausschaltung des X-Körpers durch Knochenkohle in Blutnährmitteln und ihre differentialdiagnostische Bedeutung.

Bei Untersuchungen über die Absorption der zerstörenden Stoffe im Serum war mir aufgefallen, daß Levinthal-Agar geschüttelt mit Knochenkohle kaum mehr ein Wachstum für Influenza- und Koch-Weeks-Stämme zuläßt. Es wurden deshalb weitere Versuche über die Möglichkeit der Differenzierung von Arten, die die wachstumsfördern-Stoffe der roten Blutkörperchen benötigen, mit „Knochenkohlenährmitteln" angestellt. Die Versuche verliefen alle gleichmäßig, z. B.:

7. Versuch: 50 ccm gewöhnlicher Levinthal-Agar wird 5 Min. mit 0,5 g Knochenkohle reinst, gepulvert (Merck), geschüttelt, dann Platten gegossen.

Beimpfung mit 10 Koch-Weeks-, 6 Influenza-, 3 hämolyt. Infl.-Stämmen und einem Stamm des Bac. haemogl. canis; Kochsalzaufschwemmungen.

Ergebnis: Hämolytische Influenzabazillenstämme ++++, alle anderen Stämme ± bis —.

Durch Knochenkohle wird also im Levinthal-Agar im wesentlichen nur der X-Körper absorbiert[1]), so daß die nur auf den V-Körper angewiesenen hämolytischen Influenzabazillenstämme ungehindert wachsen können, während Influenza- und Koch-Weeks-Bazillen ebenso wie der Bacillus haemoglobinophilus canis schlecht oder nicht gedeihen, da sie zum Wachstum den X-Körper brauchen. Wie in meinen früheren Arbeiten (Weichardts Ergebnisse. Bd. 6. S. 362; ds. Zentralbl. II. Mitteilung, ferner in der Inaug.-Diss. von Gehlen, l. c.) dargelegt wurde, steht fest, daß das Ammenwachstum nur dann zustande kommen

1) Man kann ebensogut Reduktionswirkung annehmen.

kann, wenn der X-Körper im Nährmittel vorhanden ist. Dementsprechend tritt auch auf einem Levinthal-Agar, dessen X-Stoffe an Knochenkohle adsorbiert sind, kein Ammenwachstum auf. Setzt man zu dem Knochenkohleagar ein den V-Körper ausschaltendes Serum, so wird entsprechend den bisherigen Befunden auch das Wachstum der hämolytischen Influenzabazillenstämme beeinträchtigt oder unmöglich gemacht.

Auf Grund der Versuche mit Körperflüssigkeiten und Knochenkohle komme ich nun zur gleichen Einteilung wie oben Fildes.

Levinthal-Agar enthaltend	X mit V	X ohne V (Serumwirkung)	V ohne X (Knochenkohle)
Influenzabazillen	+	—	—
Koch-Weeks-Bazillen	+	—	—
Bac haemogl. canis	+	+	—
Hämolytische Influenzabaz.	+	—	+

Zusammenfassung.

Der V-Körper der roten Blutkörperchen ist zum Wachstum der Influenza wie Koch-Weeks-Bazillen ebenso nötig wie der X-Faktor. Auf diese beiden wachstumfördernden Stoffe sind hämolyt. Influenzabazillen und Bac. hämoglobinophilus canis nicht angewiesen, die einen benötigen nur den V-, der andere braucht nur den X-Körper. Da manche aktive Körperflüssigkeiten den V-Körper in Nährmitteln verringern oder vernichten, gelingt es mit derartigen Nährmitteln, Influenza- und Koch-Weeks-Bazillen ebenso wie hämolyt. Influenzabazillen vom Bac. haemoglobinophilus canis zu trennen. Durch Adsorption des X-Körpers an Knochenkohle kann man ein Blutnährmittel herstellen, das nur hämolyt. Influenzabazillen üppig gedeihen läßt. Influenza- und Koch-Weeks-Bazillen benötigen in gleicher Weise beide Stoffe und wachsen nicht mehr, wenn durch Serum oder Knochenkohle einer der beiden Stoffe unwirksam gemacht wurde.

Dem Hilfsausschuß der Rockefeller-Stiftung danke ich für Unterstützung zur Ausführung dieser Arbeit. Herrn Carl Hackenbach (Nürnberg) bin ich für Ueberlassung von Kaninchen und Ratten zu Dank verpflichtet.

Versuche über die Infektionsfähigkeit des Milzbrandbazillus.

[Aus dem deutschen hygienischen Institut der Universität Prag (Vorstand: Prof. Bail).]

Von Dr. **Shokichi Katzu.**

Besredka hat in einer Reihe von Mitteilungen (Ann. de l'Inst. Past. 1921. p. 421; 1922. p. 562 mit de Trévise) auf die Erscheinung aufmerksam gemacht, daß die Infektion von empfindlichen Labo-

ratoriumstieren (Meerschweinchen, Kaninchen) durch die Haut sehr leicht erfolgt und von tödlichem Ausgange begleitet ist, auf anderem Wege aber (intraperitoneal, intravenös, intratracheal) nicht gelingt, sobald dabei eine Infektion der Haut vermieden werden kann. Die damit hergestellte eigentümliche Beziehung des Infektionserregers zum Hautgewebe kommt auch dadurch zum Ausdrucke, daß die bekanntlich schwer, mindestens nur in einem Teile der Fälle mögliche Immunisierung von Meerschweinchen mit abgeschwächten Kulturen, leicht gelingt, sobald man sie streng von der Haut aus vornimmt. Sie schützt selbst vor der etwa 200fach tödlichen Infektion mit Milzbrandblut. Es braucht nicht erst darauf hingewiesen zu werden, welch große Bedeutung dieser Erkennung des Milzbranderregers als eines sozusagen spezifisch dermatotropen Virus zukäme, ganz abgesehen davon, daß die bisher meist geltende Auffassung des Milzbrandbazillus als eines fast auf jedem Wege höchst infektiösen Mikroorganismus eine tiefgreifende Aenderung erfahren müßte. Aus diesen Gründen haben die Besredkaschen Versuche sehr bald Nachprüfung durch andere Autoren erfahren, die bisher widerspruchsvoll genug ausgefallen sind.

Balteano (Ann. de l'Inst. Pasteur 1922. p. 806; Compt. rend. Soc. Biol. T. 87. 1922. p. 653 und 655) infizierte Kaninchen und Meerschweinchen. Von den letzteren überlebte 1 die enorme Menge von 0,5 ccm Bouillonkultur intrakardial. Je 3 erhielten Kapillaren mit Agarkultur Milzbrand intraperitoneal und subkutan, die später zerbrochen wurden und überlebten. 2 andere, die kutan durch Einreiben und intrakutan mit 0,1 ccm derselben Kultur injiziert wurden, erlagen nach 3 Tagen. Aitoff (Ann. de l'Inst. Past. 1922. p. 567) brachte Mäusen, Ratten, Meerschweinchen und Kaninchen dichte Agarausschwemmungen in den unverletzten Bindehautsack, in dem die Bakterien mindestens 24 Std., aber auch bis zu 7 Tagen nachweisbar blieben: alle 18 Tiere überlebten. Auch Eindringen der Bazillen in natürlich erkrankte oder künstlich verletzte Bindehaut führte nicht zum Tode, und selbst Infektion mit Milzbrandblut wurde (außer von trächtigen Weibchen) überstanden. Brocq, Rousseau und Urbain (Compt. Rend. Soc. Biol. T. 89. p. 20, 487, 783; Ann. de l'Inst. Past. 1924. p. 268) immunisierten Pferde mit abgeschwächten Kulturen intrakutan. Die Tiere überstanden schwerste Infektion mit virulentem Milzbrand, ohne daß schützende Eigenschaften in ihrem Blute auftraten. Dies, sowie das rasche Eintreten des Schutzes bei forcierter Hautbehandlung betrachten sie als Beweis für die reine Kutiimmunität der Tiere. Mazucchi (zit. nach Bull. de l'Inst. Past. 1923. p. 851) bestätigte die Befunde Besredkas mit dem Zusatze, daß das Ueberstehen der pleuralen oder peritonealen Infektion keine Immunität hinterläßt; die kutiimmunisierten Tiere zeigen keinen Antikörpergehalt im Blute. Combieseo (Compt. Rend. Soc. Biol. T. 89. p. 640) fand, in Uebereinstimmung mit Besredka, die intraperitoneale, intravenöse und subkutane Infektion bei Kaninchen und Meerschweinchen unwirksam, außer wenn es sich um sehr große Bazillenmengen handelte. Direkte intrapulmonale Infektion führte hingegen zum Tode. Später (Compt. Rend. Soc. Biol. T. 90. p. 725) scheint er von der Zustimmung der Besredkaschen Theorie zurückzukommen. Hababou-Sala (Compt. Rend. Soc. Biol. T. 90. p. 849) machte Milzbrand durch planmäßige Passage von Ratten für diese hypervirulent und zeigte dann, daß sie sich wie Meerschweinchen verhielten, d. h. nur von der Haut aus empfindlich waren. Immunität hinterließen die subkutanen, erfolglosen Impfungen (Glasröhrchen unter der Haut, die nach erfolgter Vernarbung zerbrochen wurden) nicht. Brocq-Rousseau und Urbain immunisierten nach einer neueren Mitteilung (Compt. Rend. Soc. Biol. T. 90. p. 1307) Meerschweinchen intrakutan und infizierten sie mit verschiedenen, sehr virulenten Milzbrandstämmen in die Nieren, Leber, Peritoneum ohne Erfolg. Velu (zit. nach Bull. de l'Inst. Past. 1924. p. 620) erzielte bei Schafen und Rindern eine überaus hohe und rasch eintretende Immunität auf intrakutanem Wege. Plotz (Ann. de l'Inst. Past. 1924. p. 169) brachte Milzbrand, dessen unveränderte Virulenz er kontrollierte, in Kapseln, am besten aus dünnem Glase, unter die Haut von Kaninchen und zerbrach diese nach wechselnder Zeit. Sobald vollständige Vernarbung der Haut eingetreten war, etwa von 4 Tagen ab, überlebte eine größere Anzahl der Tiere (48 Proz.). Er nimmt an, daß die verstorbenen Tiere infolge einer Verletzung des Hautgewebes beim Zerbrechen des Glases infiziert worden

seien. Immunität zeigen die überlebenden Tiere nicht oder nur sehr wenig, während durch Hautbehandlung von Kaninchen (mit abgeschwächten Stämmen) ein sehr wirksamer Schutz zu erzielen war.

Während diese zahlreichen Angaben durchaus bestätigend für die Besredkaschen Ansichten lauten, finden sich auch gegenteilige vor. Glusmann (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 102. S. 218) gelang es überhaupt nicht, durch kutane (Einreibung), intrakutane oder subkutane Vorbehandlung mit abgeschwächtem Milzbrand Meerschweinchen zu immunisieren. Tada (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 91. S. 477) erlangte zwar in einem Teile seiner Tiere Immunität nach kutaner, aber in einem ebenso großen Teile den gleich dauerhaften Schutz auch mit subkutaner und intramuskulärer Impfung; er spricht sich direkt dagegen aus, daß das Hautorgan bei der Milzbrandimmunität eine bevorzugte Rolle spielt. Cernaiann und Sukatzeanu impften 19 Kaninchen und Meerschweinchen mit 4 verschiedenen Milzbrandstämmen auf verschiedenem Wege. Der Empfindlichkeit nach folgten aufeinander: Gehirn, Haut, Schleimhaut, Pleura, Blut, Leber, Peritoneum. Sie sind geneigt, die von Besredka abweichenden Resultate mit der abweichenden Virulenz der Bakterien zu erklären. Auch Bachmann, Beltrami und Romat (zit. nach Plotz) erhielten tödlichen Milzbrand bei Kaninchen nach intravenöser und subkutaner Impfung unter weitgehenden Kautelen. Den bestätigenden stehen somit vollständig ablehnende Angaben gegenüber, so daß von vornherein angenommen werden kann, daß die Versuche insofern schwierig sind, als sie nur unter Einhaltung bestimmter Bedingungen gelingen können.

In den viele Jahre fortgeführten Untersuchungen des hygienischen Institutes über Milzbrand haben sich mehrfach Befunde ergeben, die mit den Vorstellungen des Milzbrandbazillus als eines unbedingten Infektionserregers nicht recht übereinstimmten und die durch Besredkas Angaben einer Erklärung, oder doch der Herstellung eines Zusammenhanges fähig erschienen. Matsumoto (Ztschr. f. Immunf. Bd. 40. S. 402) hat kürzlich auf solche Besonderheiten aufmerksam gemacht. Es muß daher eine planmäßige Untersuchung der Beziehungen des Milzbrandes zur Haut beim Meerschweinchen von Interesse und auch von Wert für weitere Ermittlungen sein.

Naturgemäß hatte sich die Untersuchungsmethode wenigstens im Anfang ganz an die Besredkas anzuschließen, und doch ergab sich gleich zu Beginn die Notwendigkeit, davon abzuweichen. Besredka bewirkte die Hautinfektion in der Regel durch Einreiben seiner Kultur auf die rasierte Haut, was sich aber in den eigenen Versuchen als zu unsicher erwies. Obwohl der benützte, virulente Milzbrandstamm bei subkutaner Einspritzung eine absolute Virulenz besaß, d. h. jede Menge einer Verdünnung tödlich war, in der ein Bazillus mit Sicherheit angenommen werden konnte, blieben doch Tiere, denen viel geringere Verdünnungen eingerieben wurden, so oft am Leben, daß die Methode als zu unsicher aufgegeben werden mußte. Auch erlaubt sie selbstverständlich kein irgendwie kontrollierbares, quantitatives Arbeiten. Deshalb wurde sie durch die übliche Methode der intrakutanen Einspritzung kleiner Flüssigkeitsmengen ersetzt, die an der dicken Nacken- und Rückenhaut des Meerschweinchens sehr sicher durchgeführt werden kann.

Es ist möglich, daß die geringe Sicherheit der Milzbrandeinreibung in die Haut, die in den eigenen Versuchen hervortrat, verglichen mit der offenbar sehr großen Sicherheit, die sich in den Besredkaschen Versuchen ergab, auf einer besonderen Stammeseigentümlichkeit der Kulturen beruht, eine Vermutung, die nur durch vergleichende Versuche zu erweisen wäre, die aber viel für die Verschiedenheit der Ergebnisse erklären würde.

Der 1. Versuch mit virulentem Milzbrand (eine ursprünglich von Prof. Sobernheim überlassene Kultur, die durch oft wiederholte

Impfung auf Mäuse, Meerschweinchen und Kaninchen absolut virulent in obigem Sinne erhalten blieb) umfaßte 5 Meerschweinchen, die, wie immer, 3—400 g schwer waren.

M. 1 erhielt 0,2 einer Brühezuchtverdünnung intraperitoneal. Die Injektion wurde so gemacht, daß die sterile Kanüle durch die rasierte Bauchhöhle gestoßen wurde, erst dann wurde die Spritze aufgesetzt, nach vollzogener Einspritzung die Spritze von der Kanüle abgehoben und mittels einer neu aufgesetzten Spritze 2mal je 1 ccm steriler Kochsalzlösung injiziert. Erst dann erfolgte die Herausnahme der Nadel, die auf diese Weise ausgewaschen werden sollte. Die Methode erwies sich als ungenügend, denn schon nach 20 Std. war Hautödem deutlich nachweisbar. Tod nach 44 Std. mit Hautödem und typischem Milzbrand.

Ebenso infiziert wurden die Tiere 2 und 5, die nach 40 und 47 Std. starben. Alle Tiere hatten in der Haut so große Oedembildungen, daß an der von hier ausgehenden Infektion um so mehr nicht zu zweifeln war, als die Veränderungen im Peritoneum sehr gering waren, sich auf Rötungen beschränkten, während es zur Bildung des ganz eigenartig dicken leukozytenreichen, aber phagozytosefreien Exudates gar nicht gekommen war. Man könnte daraus schließen, daß die ins Peritoneum gelangten Bazillen (sicher die größte Mehrzahl) nicht gehaftet haben.

Das Tier 3 wurde auf der Bauchhaut rasiert, die Infektionsflüssigkeit (0,2 ccm) in einen kleinen Wattetampon aufgesaugt und energisch eingerieben. Es kam wohl am nächsten Tage zu einer kleinen Schwellung, die aber bald verschwand. Die gleiche Einreibung wurde nach 4 Tagen mit derselben Erfolglosigkeit wiederholt, nach weiteren 4 Tagen gelang sie, und das Tier starb mit schwerem Hautödem schon nach 22 Std.

Meerschweinchen 4, das die Injektionsdosis intrakutan erhalten hatte, zeigte nach 20 Std. rasch zunehmendes Oedem und starb nach 47 Std. typisch.

Der Versuch kann nichts entscheiden, da die intraperitoneale Injektion nicht rein gelungen war; es mußte, wie erwähnt, nur auffallen, daß das Peritoneum trotz der relativ großen hineinverimpften Bazillenzahl so gut wie nicht reagiert hatte. Die Einreibung hat sich nicht als sicher erwiesen, insofern man nicht sagen kann, ob die Bazillen überhaupt gehaftet haben; tritt das ein, dann ist allerdings eine sehr schwere Infektion die Folge.

In der 2. Versuchsreihe wurde für die intraperitoneale Infektion eine andere Methode gewählt. Nach Rasieren und Desinfizieren der Bauchhaut wurde ein Schnitt durch dieselbe gemacht, der die Muskulatur freilegte und gerade so groß war, daß die Ränder klafften. Durch die Muskulatur wurde eine sehr enge sterile Kanüle gestoßen, die Spritze aufgesetzt und jetzt wie bei den früheren Tieren injiziert und mit NaCl-Lösung nachgespült. Vor dem Herausziehen der Kanüle wurde aber 1 Tropfen Jodtinktur in die Wunde gebracht, so daß die Kanüle von dieser allseitig umgeben war. Die kleine Hautwunde blieb ohne Naht, verschorfte und hat nie üble Erscheinungen gemacht.

2 Meerschweinchen erhielten intraperitoneal je 0,2 ccm der Verdünnung 1:1000. Nr. 6 starb nach 70, Nr. 7 nach 38 Std., alle mit Milzbrandsepsis. Beide Tiere zeigten an der Haut der Injektionsstelle außer dem Wundschorf keine Veränderungen. Beide ließen aber auch intraperitoneale jede erhebliche Reaktion vermissen, Exsudat hatte sich

nicht gebildet. Nr. 8 erhielt die gleiche Dosis mit Watte in die Haut gerieben, die vorher durch Reiben mit Glaspapier gereizt war: die Reizung war jedenfalls heftig gewesen, denn wenn auch keine Verletzung sichtbar war, zeigte sich doch am anderen Tage ein die Haut bedeckender Schorf. Das Tier starb nach 44 Std. mit Hautmilzbrand. Bei beiden intraperitoneal gestorbenen Tieren ist eine Hautinfektion nicht nachzuweisen gewesen. Oedem war sicher auch nicht in Spuren vorhanden. Dennoch spricht der Befund am Peritoneum auch nicht für dieses als Ausgangsstelle der Infektion, deren Frage offen bleiben muß.

Die Wiederholung des Versuches auf die gleiche Art an Nr. 9 und 10 (intraperitoneal) ergab Tod nach 52 und 48 Std. No. 9 hatte mächtiges Hautödem und überdies Exsudat mit massenhaften Bazillen in der Bauchhöhle, Nr. 10 aber bestimmt keine Veränderungen an der Haut der Infektionsstelle und auch keine merklichen Entzündungserscheinungen in der Bauchhöhle. Nr. 11, dem die Impfmenge auf die Haut eingerieben war, überlebte ohne Erscheinungen.

Von den 4 intraperitoneal infizierten Tieren beider Versuche fällt das eine mit offenkundiger, trotz den Vorsichtsmaßregeln erfolgter Hautinfektion weg. Die anderen starben bestimmt ohne solche Infektion, die also bei virulentem Milzbrand, auch ohne von der Haut auszugehen, eintreten kann. Wo der erste Angriffspunkt der Bazillen gewesen ist, hat sich freilich nicht feststellen lassen. Wirkliche Entzündungserscheinungen mit Bildung des für Milzbrand kennzeichnenden Exsudates zeigte nur das Peritoneum von Nr. 9, das überdies kutan infiziert war. Bedenkt man, daß bei den früheren Versuchen mit intraperitonealen Meerschweincheninfektionen auf die Bildung subkutaner Oedeme nur nebenbei geachtet worden war, so ist es wohl einer neuerlichen Untersuchung wert, ob die dabei beobachteten peritonealen Veränderungen hauptsächlich einer primären Infektion des Peritoneums entsprechen, oder gleichzeitig mit einer von anderer Stelle ausgehenden auftreten. Die Milzbrandsepsis von Meerschweinchen 10 wäre tatsächlich als kryptogenetisch zu bezeichnen gewesen.

Diese ersten Versuche sprechen somit teils für, teils gegen die Ansicht Besredkas. Sicher sind Tiere nach rein intraperitonealer Impfung eingegangen, aber daß die Impfung wirklich primär am Peritoneum gehaftet hätte, ließ sich nicht nachweisen.

Es lag nun die Vermutung nahe, daß die Impfung absolut (Bazillenzahl) oder relativ (zu große Virulenz) zu schwer gewesen sei, um die von Besredka hervorgehobene Besonderheit der Infektionsweise hervortreten zu lassen. Deshalb wurde jetzt mit genau bekannten, abgestuften Bakterienmengen (aus höchstens 20stünd. Fleischbrühezuchten) gearbeitet, überdies auch mit anderen Milzbrandstämmen. In der Tat gelang es jetzt, in einer Reihe von Fällen die Angaben Besredkas zu bestätigen.

M. 85 erhielt am 10. 8. 0,1 ccm einer Brüheverdünnung virulenten Milzbrandes 1:100000 (39 Bazillen) intrakardial. Es blieb ohne jede Krankheit. Am 22. 8. erhielt es 33 virulente Bazillen intrakutan ohne Reaktion, am 3. 9. 58 Bazillen intrakutan und überlebte auch jetzt.

M. 86 erhielt gleichzeitig die gleiche Injektion intraperitoneal, überlebte, ebenso überstand es die intrakutane Infektion am 22. 8., erlag aber der am 3. 9. am 3. Tag mit Oedem und Milzbrandsepsis.

M. 87 erhielt gleichzeitig mit 85 und 86 die gleiche Infektion intrakutan, der es am 3. Tage mit schwerstem Milzbrandbefunde erlag.

M. 88 erhielt ungefähr das Zehnfache der bei M. 85 angewendeten Infektion (385 Bazillen) intrakardial und überlebte ohne Reaktion. Am 22. 8. erlag es den intrakutan injizierten 33 Bazillen am 4. Tage mit typischen Milzbrandbefunden.

M. 89, wie 88 aber intraperitoneal infiziert, überlebte, überstand auch die intrakutane Infektion am 22. 8., erlag aber der intrakutanen Impfung mit 58 Bazillen am 3. 9. am 3. Tage.

M. 90 wie 88 und 89 intrakutan am 10. 8. infiziert, starb am 3. Tage an typischem Milzbrand.

M. 91 erhielt am 10. 8. das 100fache der bei M. 85 angewendeten Dosis (ca. 4000 Bazillen) intrakardial und überlebte. Es überstand auch die intrakutane Infektion mit 33 Bazillen am 22. 8., erlag jedoch der intrakutanen Impfung mit 58 Bazillen typisch am 3. Tage.

M. 92 gleichzeitig mit 91 intraperitoneal infiziert, überlebte, erlag jedoch der intrakutanen Einimpfung von 33 Bazillen am 22. 8. nach 3 Tagen typisch.

M. 93 wie 91 und 92 am 10. 8. intrakutan infiziert, erlag typisch am 3. Tage.

Zum Versuche gehört noch das Kontrolltier 94, am 22. 8. mit 33 Bazillen intrakutan geimpft: überlebte, erlag aber der intrakutanen Injektion von 58 Bazillen am 3. 9. typisch am 3. Tage.

Ferner das Kontrolltier 95, das am 3. 9. der gleichen intrakutanen Impfung am 3. Tage zum Opfer fiel.

Der Versuch hat in zweifacher Hinsicht Interesse: 1) zeigt er, daß 6 Tiere, welche Milzbrand von sehr geringer Menge an bis zur hundertfach erhöhten Bazillenzahl intrakardial oder intraperitoneal, bei sorgfältiger Vermeidung der Hautinfektion erhalten hatten, die Infektion nicht angehen ließen, während 3 in ganz entsprechender Weise intrakutan an Milzbrand starben. Das stimmt mit dem Ausfall der Besredkaschen Versuche weitestgehend überein und zeigt, daß tatsächlich die Infektionsfähigkeit des Milzbrandes in hohem Grade von einem bestimmten Gewebe, auf das er treffen muß, abhängig ist. Daß solche Versuche nicht mit vollster Regelmäßigkeit gelingen, auch anfänglich zu anderen Ergebnissen für die intraperitoneale Infektion bei Meerschweinchen führten, kann bei der sehr großen Infektionskraft des benützten Stammes kaum wundernehmen.

Weiter zeigt der Versuch, daß die erfolglosen intrakardialen und intraperitonealen Infektionen keinerlei Immunität hinterlassen. Die bei den 6 Tieren und einem Kontrolltiere am 22. 8. gesetzte intrakutane Infektion muß als unsicher bezeichnet werden. Die Keimzahlbestimmung ergab allerdings, daß in der eingespritzten Flüssigkeitsmenge 33 Bazillen vorhanden waren; da aber das Kontrolltier und 4 Versuchstiere keine Spur einer Reaktion zeigten, muß wohl angenommen werden, daß sie entweder keine Bazillen erhalten hatten, oder daß es auch für diesen Stamm eine kleinste Bazillenmenge gibt, die schadlos vertragen wird. Jedenfalls waren die beiden Tiere, die selbst dann noch erlagen, 2 vorbehandelte, können also keinerlei Immunität gehabt haben. Wie wenig das auch für die anderen der Fall war, bewies die intrakutane Infektion am 3. 9., die mit 58 Bazillen ausgeführt wurde und die überall typischen Milzbrandtod ohne jede Verzögerung zur Folge hatte. Die Einverleibung von etwa 40—4000 lebenden Bazillen auf anderem als intrakutanem Wege hat also keinerlei Abwehrreaktion des Organismus ausgelöst.

Ein anderer, aus Karpathorußland stammender Stamm VII hatte im Kaninchenversuch eine wesentlich geringere Virulenz. Beim Meerschweinchen trat dies allerdings nur wenig hervor, denn die an den Tieren 47, 48, 51a, 51b vorgenommene intrakutane Impfung mit je 0,1 ccm einer 1:10, 100, 1000, 10000 verdünnten Fleischbrühezucht führte bei allen Tieren zum Tode nach 3, 4, 5 und 14 Tagen. Diese Verzögerung des Verlaufes, im Gegensatz zu dem völlig regelmäßigen

Ablauf der Infektion innerhalb 3 Tagen beim vorigen Stamm, zeigt auch für das Meerschweinchen die geringere Virulenz an. Daß das Tier 52 mit 0,1 ccm 1:100000 Brühezucht überlebte, soll hingegen nicht hoch eingeschätzt werden, da die Keimzahlbestimmung nur noch 14 Bazillen ergab, und es dann nicht sicher ist, zu sagen, ob wirklich lebende kräftige Keime in den Infektionsort eingebracht wurden.

Am 2. 7. wurden die Tiere 53—55 mit je 0,1 ccm 1:100 verdünnter Bouillon etwa 9000 Bazillen intrakardial, 56—58 intraperitoneal, und 59—61 intrakutan geimpft. Letztere 3 starben sämtlich typisch, 2 am 4., 1 schon am 3. Tage an Milzbrand. Von den intrakardial geimpften starb Nr. 53 nach 5 Tagen, von den intraperitoneal geimpften Nr. 57 am 7. Tage an Milzbrand; bei beiden bewies das schon am Tage nach der Impfung aufgetretene und von da an stark verbreitete Oedem, daß die Infektion teilweise an der Haut gehaftet hatte und wahrscheinlich von ihr ausgegangen war. Die 4 anderen Tiere zeigten keinerlei Krankheit. Einer 10 Tage später vorgenommenen intrakutanen Infektion mit 0,1 ccm der Verdünnung 1:1000, die diesmal aber 16000 Bazillen enthielt, erlag Nr. 54 nach 3 Tagen, das Kontrolltier 62 nach 4 Tagen: Nr. 54, 56 und 58 überlebten.

Bei einer Wiederholung (etwa 3 Monate nach der 1. Versuchsserie) mit dem gleichen Stamme VII ergab die Virulenzbestimmung bei intrakutaner Einspritzung von 1:100 und 1:1000 verdünnter Brühezucht (je 0,1 ccm) Tod der Tiere 100 und 101 nach 3 und 4 Tagen mit typischem Befunde.

Mschw. 102 erhielt 0,1 ccm 1:10000 verdünnter Brühezucht (73 Baz.) intrakardial
Mschw. 105 erhielt 0,1 ccm 1:1000 verdünnter Brühezucht (800 Baz.) intrakardial und überlebte.
Mschw. 108 erhielt 0,1 ccm 1:100 verdünnter Brühezucht (7000 Baz.), starb am 3. Tage an Milzbrand, doch hatte sich schon am Tage nach der Impfung ein nußgroßes Oedem an der Impfstelle gebildet und bis zum Tode ausgebreitet.
Mschw. 103 erhielt die gleiche Dosis wie 102 intraperitoneal und überlebte.
Mschw. 106 erhielt die gleiche Dosis wie 105 intraperitoneal, starb am 3. Tage an Milzbrandsepsis, zeigte aber weder in der Haut noch im Peritoneum Anzeichen für das primäre Haften der Infektion.

Mschw. 109 erhielt die gleiche Dosis wie 108 und überlebte.

Von den 3 Tieren 104, 107, 110 mit den entsprechenden Mengen intrakutan geimpft, starben 107 und 110 nach 3 Tagen, 104 nach 4 Tagen an typischem Milzbrand mit Oedem.

Von dieser Serie scheidet Nr. 108 leider aus, da die Infektion offenkundig von der Hautwunde ausgegangen war. An schon früher hervorgehobenen Befund erinnert Nr. 106, bei dem der Infektionsort gänzlich unklar blieb: jedenfalls deutete nicht das kleinste Anzeichen auf eine Hautinfektion, und auch am Infektionsorte, dem Peritoneum, war keine Spur eines abnormen Befundes, nicht einmal Rötung wahrzunehmen. Daß Nr. 109 mit der 10fach größeren Bazillenmenge überlebt hatte, vermehrt nur die Unerklärlichkeit des Ergebnisses.

Was das spätere Schicksal der Tiere betrifft, so überstand Nr. 102 eine 12 Tage später vorgenommene intrakutane Infektion mit 114 Bazillen, erlag aber der nach weiteren 11 Tagen mit 382 Bazillen am 4. Tage typisch. Nr. 105 starb schon nach der 1. Infektion am 3. Tage. 103 und 109 verhielten sich genau wie 105. Von einer durch die Erstinfektion erlangten Immunität kann also keine Rede sein.

Sieht man von den früher angeführten Einzelheiten, mißglückten Versuchen und dergleichen ab, so sind auch die Versuche mit dem

Stamme VII im ganzen als Bestätigungen der Besredkaschen Angaben zu deuten. Daß nicht jeder Einzelversuch eindeutig in diesem Sinne gelingt, kann nicht verwundern. Zusammengehalten mit zahlreichen, im Laufe der Jahre in den Milzbrandarbeiten des hiesigen Institutes gesammelten, aber nicht planmäßig verfolgten Erfahrungen ergibt sich doch bei aller Vorsicht der Schluß, daß Milzbrandinfektionen bei dem höchst empfänglichen Meerschweinchen auf dem Wege einer Impfung (intrakardial, intraperitoneal) nur schwerer, in vielen Fällen überhaupt nicht gelingen, die auf anderem Wege (intrakutan) sicher haften.

Die nicht angehenden intrakardialen oder intraperitonealen Impfungen hinterlassen keine irgendwie sicher nachzuweisende Immunität, woraus sich ergibt, daß die eingeführten Bazillen wahrscheinlich keine Reaktion des Tierkörpers hervorgerufen haben, also auch nicht zu einer Vermehrung im Körper gekommen sind. Mit Sicherheit läßt sich das allerdings nicht aussagen, da es sich um Meerschweinchen handelte, bei denen Immunität viel schwerer als beim Kaninchen etwa zu erzielen ist. Immerhin hätte man aber doch mindestens eine Veränderung im Ablaufe der intrakutanen Nachimpfungen erwarten müssen.

Es ist aber weiter wahrscheinlich, daß verschiedene sonstige Umstände den Ausfall der Impfungen beeinflussen. So dürfte in Uebereinstimmung mit Combiesco die Zahl der eingeimpften Bazillen von Bedeutung sein, namentlich für intraperitoneale Impfungen. Der Ausfall der Anfangsversuche beweist, daß von der intraperitonealen Infektion aus der Milzbrand angegangen ist, obwohl im Sektionsbefunde nichts dafür sprach, daß die 1. Vermehrungsstätte der Bazillen die Bauchhöhle gewesen sei. Es fehlte jede sichere Entzündung und Exsudatbildung und auch der Befund der mikroskopischen und kulturellen Prüfung der Peritonealfläche unterschied sich nicht merkbar von dem, der bei sonstigen Tieren mit Milzbrandsepsis zu erheben war. Auch Tier Nr. 105 starb bei Anwendung einer relativ geringen Impfmenge des Stammes VII auf diese Weise. So ungeklärt also diese Fälle auch bleiben müssen, zeigen sie doch, daß eine Infektion unter Umständen auch ohne Hauteinpflanzung der Bazillen gelingen kann.

Sieht man aber, daß Tier 105 in dieser eigenartigen Weise von der Bauchhöhle aus erfolgreich infiziert wurde, Tier 106 hingegen mit einer größeren Bazillenmenge nicht, so ist eine Erklärung nur durch individuelle Besonderheiten der Versuchstiere möglich, besser gesagt, es ist kein Grund für dieses Verhalten erfindlich.

Mit Rücksicht auf negative Befunde anderer Autoren ist ferner nicht auszuschließen, daß auch die Art des benützten Milzbrandstammes eine Rolle spielt. Es mag nicht mit jedem eine Wiederholung solcher Impfungsversuche in gleicher Weise gelingen.

Für die hier verwendeten beiden Stämme kann aber, von den erwähnten Einschränkungen abgesehen, die Auffassung Besredkas bestätigt werden. Dabei ist die schon erwähnte Einschränkung zu machen, daß die Versuche mehrfach den Eindruck hinterließen, daß es nicht eigentlich die Haut sei, in welche der Milzbrandbazillus gelangen müsse, um infizieren zu können. Es scheint, als ob ein allgemeiner verbreitetes Gewebe die primäre Ansiedlungsmöglichkeit gewährt. Wäre dies rein hypothetisch, etwa das Bindegewebe, so kann die Bevorzugung der Haut darin liegen, daß dasselbe hier sehr reichlich oder in besonders günstiger Ausbildungsform vertreten ist. Aber

auch von anderen Körperstellen aus ist eine Infektion möglich, nur schwerer deshalb, weil hier das Bindegewebe nicht in der geeigneten Weise vorliegt. So würden sich nicht nur die öfters erfolgreichen intraperitonealen Infektionen erklären, sondern damit auch die epidemiologischen Erfahrungen erklären lassen, welche wie die Hadernkrankheit des Menschen eine Inhalationsinfektion oder bei Darmmilzbrand von Rindern eine stomachale ohne Beteiligung der Haut voraussetzen lassen. Genauer läßt sich freilich das empfindliche Gewebe zurzeit nicht angeben.

Ein 2. Hauptteil der Besredkaschen Versuche bezieht sich auf die Immunisierung von Meerschweinchen von der Haut aus. Er verdient ein ganz besonderes Interesse, da diese Tiere im Gegensatz zu Kaninchen nur sehr schwer zu schützen sind. Zwar ist die Möglichkeit einer Immunitätserzeugung mittels verschiedener Methoden auch für Meerschweinchen längst erwiesen, immerhin bleibt sie eine schwierige, unsichere und mit vielen Verlusten verknüpfte Aufgabe. Nach Besredka ist sie aber verhältnismäßig leicht zu erzielen, wenn Meerschweinchen planmäßig mit verschieden stark abgeschwächten Vakzins von der Haut aus behandelt werden.

Aus den schon früher erwähnten Gründen mußte die Einreibung in die Haut unterlassen und durch intrakutane Einspritzung ersetzt werden. Insofern unterscheiden sich also die eigenen Versuche von denen Besredkas und sind mindestens quantitativ nicht direkt vergleichbar. Verwendet wurde zunächst ein lange im Laboratorium fortgezüchtetes Vakzin, das nur ausnahmsweise Meerschweinchen mit 0,1 ccm Brühekultur tötete, dann ein selbsthergestelltes aus dem früher erwähnten virulenten Stamme, das in der Menge von 0,1 ccm Brühekultur subkutan Meerschweinchen sicher tötete, in Verdünnungen aber nur ausnahmsweise zu infizieren vermochte. Kaninchen starben nicht.

Je 3 Tiere wurden intrakardial, intraperitoneal und intrakutan vorbehandelt.

Nr. 63, 64, 65 erhielten 18. 7. je 0,1 ccm reine Brühekultur Vakzin intrakardial. Von ihnen starb Nr. 63 am 3. Tage mit reichlich geronnenem Blute in Perikard und Pleuren. Sonst sprach im Befunde nichts für eine Infektion, kulturell ließ sich jedoch überall Milzbrand nachweisen. Nr. 64 starb gleichfalls am 3. Tage und zeigte eine schwere Pericarditis und beiderseitige Pleuritis mit eitrigem Exsudate. Sie machte zunächst den Eindruck einer Sekundärinfektion, doch waren im Exsudate, wie in allen Organen schon mikroskopisch nur dicke Bazillen nachweisbar, die Kulturen ergaben überall reinen Milzbrand.

Nr. 65 überstand die Injektion wie die weiteren intrakardialen von je 0,1 ccm abgeschwächten Milzbrandes in den Verdünnungen 1:1000, 1:100, 1:10, am 27. 7., 7. 8. und 18. 8. Am 27. 8. erhielt das Tier 0,1 ccm unverdünnter Brühekultur des abgeschwächten Milzbrandes intrakutan. Es überlebte mit geringer Schwellung an der Injektionsstelle, während das Kontrolltier (das auch als Kontrolle für die folgenden gleichzeitig infizierten Tiere diente) am 5. Tage an Milzbrandsepsis starb. Einer intrakutanen Infektion mit 521 virulenten Bazillen am 19. 9. erlag das Tier am 3. Tage, etwas früher, als die normale Kontrolle. Die Nr. 66, 67, 68 erhielten am gleichen Tage mit den früheren die gleiche Injektion von Vakzin intraperitoneal und überlebten. Dem folgenden intraperitonealen, von 1:1000 verdünnten abgeschwächten Milzbrand erlag Nr. 68 nach 6 Tagen mit Milzbrand.

Die übrigen überstanden sie und die weiteren intraperitonealen Infektionen des 7. und 18. 8., sowie die intrakutane des 27. 8., letztere mit geringer Oedembildung. Der intrakutanen Infektion des 19. 9. erlagen beide am 5. und 3. Tage.

Die Tiere 69, 70, 71 erhielten die Injektion des 18. 7. intrakutan. Als ganz ungewöhnlich muß der danach am 3. Tage erfolgte Tod von Nr. 70 mit nachweisbarem Milzbrandbefund (ohne jede lokale Reaktion) bezeichnet werden. Die übrigen Tiere überstanden alle oben erwähnten Infektionen, die immer intrakutan vorgenommen wurden. Der Infektion mit virulentem Milzbrand am 19. 9. erlagen aber beide nach 4 und 5 Tagen.

In diesen Zusammenhang gehört noch ein Kontrolltier, das am 27. 7. (ohne vorherige Vakzinebehandlung) abgeschwächten Milzbrand (0,1 ccm 1:1000) intrakutan erhalten hatte und dann wie die übrigen Tiere intrakutan weiterbehandelt wurde. Es erlag der virulenten Infektion des 19. 9. nach 3 Tagen.

Sieht man von den Tieren 63 und 64 ab, deren intrakardiale Injektion wahrscheinlich nicht einwandfrei gelungen war, von denen aber Nr. 64 jedenfalls einen sehr ungewöhnlichen Befund ergab, und von Nr. 68, dessen Tod zu den Unverständlichkeiten gehört, die bei Arbeiten mit abgeschwächtem Milzbrand vorkommen können, so bleiben immerhin 6 Tiere, die eine vorsichtige und lange Behandlung durchgemacht haben. Aber keines derselben, auch die ausschließlich intrakutan behandelten, zeigten gegen eine nicht besonders hohe Zahl virulente Bazillen deutlichen Schutz. Höchstens das Ueberstehen der intrakutanen Infektion mit 0,1 ccm abgeschwächter Kultur könnte man als solchen bezeichnen, da unbehandelte Tiere ihr erlagen.

Auch die sonstigen Versuche, auf dem Wege intrakutaner Impfung Immunität zu erzeugen, hatten fast durchweg schlechte Ergebnisse. Allerdings muß dazu bemerkt werden, daß möglicherweise eine ganz besonders sorgfältige Auswahl der abgeschwächten Kulturen verbessernd einwirken könnte. Seit Preisz ist bekannt, daß die Abschwächung einer Milzbrandkultur bei 42° gänzlich ungleichmäßig verläuft: sie enthält nebeneinander gänzlich und nur teilweise oder auch gar nicht der Infektiosität beraubte Bakterien. Das läßt sich jederzeit bestätigen, und es scheint, als ob verschiedene Stämme hierin ein verschiedenes Verhalten zeigen würden. Aus dem hier benutzten virulenten Stamme lassen sich schon nach 24 und 48 Std. reichlich Kolonien gewinnen, die keine oder sehr stark gestörte Kapselbildung im Serum mehr zeigen und dementsprechend auch ihre Kaninchenvirulenz mehr minder vollständig eingebüßt haben. Es ist wohl anzunehmen, daß für widerstandsfähigere Tiere (Kaninchen, Schafe) gemischt abgeschwächte Zuchten vorteilhaft sind, denn wenn nur vollvirulente Bakterien fehlen, so trifft der Organismus selbst eine Auslese. Die avirulenten kommen nicht zur Geltung, die wenig abgeschwächten erzeugen die gerade hinreichende Reaktion. Beim Meerschweinchen mit seiner starken Empfindlichkeit hingegen und ähnlich bei der Maus müßte eine ganze Stufenfolge verschiedenster Abschwächungen zur Verfügung stehen, um Reaktionen genügender, aber noch ungefährlicher Stärke herbeizuführen. Dazu gehört natürlich ein sehr großer Tieraufwand, der unter den gegenwärtigen Verhältnissen nicht aufzubringen ist. Um aber diesem Ziele ungefähr näher zu kommen, wurde Milzbrandbrühekultur, verschiedene, aber immer relativ kurze Zeit bei 42° gehalten und aus-

gestrichen. Abgeimpfte Kolonien wurden auf Kapselbildung im Serum untersucht und, wenn diese verschwunden oder stark gestört schien, wurde die Kultur verwendet.

Die Tiere 37 und 38 erhielten am 26. 5. je 0,1 ccm Vakzin intraperitoneal, 39, 40, 41 intrakutan.

Am 3. 6. 0,1 ccm 1 : 10 verdünnten, 4 Tage abgeschwächten virul. Kultur, ebenso am 22. 6. 0,1 ccm 1 : 10 verdünnten, 2 Tage abgeschwächten virul. Kultur, ebenso am 24. 7 0,1 ccm unverdünnter 24 Std. abgeschwächter Kultur an alle Tiere intrakutan, am 7. 8. 0,1 ccm 1:10 verdünnter, nur 20 Std. abgeschwächter Kultur ebenfalls intrakutan.

Dieser Impfung erlagen alle Tiere, 2 nach 2, die anderen nach 3 Tagen mit Milzbrand.

Der Erfolg scheint also sehr gering und mag es auch wirklich sein. Ganz ausgeblieben kann aber eine immunisatorische Reaktion doch nicht sein, da Kontrolltiere für die der Behandlung dienenden Injektionen gestorben waren, und zwar Nr. 45 am 3. 6. nach 3, Nr. 40 am 22. 6. nach 8 Tagen.

Im ganzen wurden gegen 100 Meerschweinchen mit verschieden abgeschwächtem Milzbrand vorbehandelt, davon 42 intrakutan. Fast alle erlagen der 1. Infektion mit geringen Mengen virulenten Milzbrandes, manche auch schon weniger abgeschwächten, der aber in der weit überwiegenden Mehrzahl der Fälle vertragen wurde. Als wirklich immun können nur folgende beiden Tiere betrachtet werden:

Nr. 31 23. 5. 0,1 ccm Brühekultur abgeschwächt intrakutan.
3. 6. 0,1 ccm 1 : 10 verd. Brühe vom Stamme VII intrakutan (ist sonst regelmäßig tödlich).
22. 6. 0,1 ccm 1 : 5000 verd. virul. Milzbr. intrakutan (Kontrolltier stirbt nach 3 Tagen).
24. 7. 0,1 ccm Brühe von 24 Std. abgeschw. virul. Milzbrand intrakutan (Kontrolltier gestorben).
9. 8. 0,05 cm 1 : 1000 verd. virul. Milzbr. intrakutan.
28. 8. 0,1 ccm 1 : 1000 verd. virul. Milzbr. intrakutan.
9. 9. 0,2 ccm 1 : 1000 verd. virul. Milzbr. intrakutan.

Ferner am 3. 10., 17. 10., 31. 10. und 14. 11. steigende Mengen virulenten Milzbrandes, zuletzt 0,2 ccm der Verdünnung 1 : 1000, ohne jede Reaktion.

Meerschweinchen Nr. 3
10. 7. 0,1 ccm 1 : 10 verd. Brühekultur von 31 Std. abgeschw. virul. Milzbrand intrakutan.
25. 7. 0,1 ccm konzentr. Brühekultur 2 Tage abgeschw. virul. Milzbrand intrakutan.
12. 8., 28. 8., 9. 9., 19. 9., 3. 10., 17. 10., 30. 10., 14. 11. immer je 0,1 ccm virul. Milzbrandes von der Verdünnung 1 : 5000 angefangen bis 1 : 100.

Besondere Reaktionen traten nach diesen, für Meerschweinchen als äußerst schwer zu bezeichnenden Infektionen nicht auf. Beide Tiere, deren Serum besonders untersucht werden soll, sind in voller Gesundheit.

Ein Punkt fällt bei diesen beiden Tieren, den einzig wirklich immunen, aus einer langen Reihe, leicht auf. Während sonst eine lang dauernde, in kurzen oder langen Zwischenräumen fortgesetzte Behandlung kaum Spuren von Schutz hervorrief, sind diese Tiere schon in kurzer Zeit (Nr. 31 schon nach einer vorbereitenden Injektion) widerstandsfähig geworden. Das kann bei dem reichen vorliegenden Vergleichsmaterial gar nicht anders als durch einen besonderen individuellen Zustand der Tiere erklärt werden, ein Befund, der zur größten Vorsicht für die Beurteilung gelungener Meerschweinchenimmunisierungen auffordert.

Ueberblickt man aber das vollständige, im ganzen sehr dürftige Ergebnis der Immunisierung, so bestätigt es die alte Erfahrung, daß Meerschweinchen nur sehr schwer und nur gelegentlich gegen virulenten Milzbrand zu schützen sind. Daß eine echte Immunität auch gegen diesen zu erzielen ist, ist mehrfach beschrieben worden, aber es ist bisher noch nicht mit Sicherheit zu sagen, was solche selten vorkommende Tiere auszeichnet. Hingegen ist es verhältnismäßig leicht, gegen abgeschwächten Milzbrand zu immunisieren, der normale Tiere noch mit Sicherheit zu infizieren vermag. Man erhält den Eindruck, daß der Immunisierungsapparat beim Meerschweinchen vorhanden ist, aber meist so schwach ausgebildet, daß er durch die vollendete Aggressivität virulenter Stämme fast immer überwunden wird.

Das bei den Schutzversuchen erzielte Resultat stimmt also in der Hauptsache mit dem Gußmanns und Tadas überein. Es ist zuzugeben, daß die befolgte Methode der intrakutanen Einspritzung abgeschwächter Kulturen nicht ganz mit der Besredkas (kutane Einreibung) übereinstimmt. Da aber das Hautgewebe dadurch sicher betroffen worden ist, muß doch ein Grund für den so tiefen Unterschied der erzielten Erfolge vorhanden sein. Er dürfte aller Wahrscheinlichkeit nach in der verwendeten Milzbrandkultur zu suchen sein. Waren die Besredkas nicht vollvirulent, auf natürliche Weise durch lange Züchtung auf Nährböden abgeschwächt, was bei schlecht versporenden Stämmen vorkommt, so wird der Unterschied sofort verständlich. Denn gegen abgeschwächten, wenn auch noch für Meerschweinchen tödlichen Milzbrand lassen sich bestimmt immunisatorische Erfolge erzielen.

Im übrigen konnte in einer ganzen Reihe von Fällen die Besredkasche Beobachtung bestätigt werden, daß der Milzbrand in der Haut des Meerschweinchens besonders leicht und sicher haftet. Unbedingt tödliche, mehrfach als sehr schwer zu bezeichnende Impfungen sind nicht angegangen, wenn sie intraperitoneal oder intrakardial vorgenommen wurden. Da die Empfindlichkeit des Versuchstieres als absolut bezeichnet werden kann, muß diese Feststellung als ganz besonders bedeutungsvoll angesehen werden. Es läßt sich danach als sicher annehmen, daß die Infektion, falls sie erfolgreich sein soll, auf ganz bestimmte Körpergewebe treffen muß.

Die Haut enthält ohne Zweifel diese Gewebe in größter Menge, doch ist nach den früheren Darlegungen und in Uebereinstimmung mit epidemiologischen Daten wohl anzunehmen, daß sie auch sonst im Körper verbreitet sind. Sie genauer zu kennzeichnen, ist allerdings noch unmöglich und es läßt sich daher auch nicht sagen, ob gewisse Anteile des Organismus eines Schutzes entbehren, den andere besitzen, oder ob sie erst dem infizierenden Mikroorganismus besondere Kräfte zu verleihen imstande sind, die er sonst nicht zu entfalten vermöchte. Theoretisch bleibt wichtig, daß das Eindringen des Erregers in virulenter Form auch beim höchst empfindlichen Lebewesen allein noch nicht die Infektion zu erklären vermag.

Ueber die Brauchbarkeit des Trockenkomplements (nach Straub) zur praktischen Ausführung der Wassermannschen Reaktion.

[Aus dem Institut für Diagnostik und Forschung in Berlin.]

Von Dr. **K. E. F. Schmitz.**

Durch eine Arbeit von M. Königsfeld (Arch. f. exp. Pathol. u. Pharm. Bd. 99. S. 162) wurde die Aufmerksamkeit auf ein neues Konservierungsverfahren für Komplement gelenkt, das im wesentlichen auf einer Methode von Straub beruht. Diese Methode bedient sich eines besonderen Apparates, mit dem es möglich ist, in kürzester Zeit Flüssigkeit auf die schonendste Weise zu trocknen.

In der genannten Arbeit führt nun Königsfeld den Nachweis, das mit solcher Art hergestelltem Trockenkomplement die Lösung eines hämolytischen Systems, wie es für die Wassermannsche Reaktion benötigt wird, in unverminderter Weise bewirkt werden kann, selbst wenn seit der Konservierung dieses Komplementes über 1 Jahr vergangen war. Dieser Nachweis wurde geführt durch Titerbestimmungen des Komplementes in Vergleich zu frischen. Königsfeld zieht hieraus den Schluß, daß dieses gut aufzubewahrende Trockenkomplement für praktische Zwecke außerordentlich gut verwertbar sei.

Die Königsfeldschen Versuche erstreckten sich lediglich, wie oben auseinandergesetzt, auf die Haltbarkeit, festgestellt durch eine große Reihe von Titrationen. Um die Brauchbarkeit, z. B. für die Wassermannsche Reaktion in der Praxis zu erweisen, erschien es uns unbedingt notwendig, daß eine größere Reihe von praktischen Paralleluntersuchungen am Objekte selbst ausgeführt wurde, d. h. also, daß eine größere Menge von Patientenseren sowohl mit frischem, wie mit Trockenkomplement untersucht wird.

Dieser Aufgabe unterzogen wir uns, nachdem uns von der Firma L. W. Gans, die das Trockenkomplement nach dem Straubschen Verfahren jetzt herstellt, eine entsprechende Menge Trockenkomplement zur Verfügung gestellt worden war, und soll über die Ergebnisse dieser Untersuchungen in folgendem berichtet werden.

Zunächst überzeugten wir uns in derselben Art, wie Königsfeld vorgegangen war, daß der Titer des Trockenkomplements durch die Konservierung im Vergleich zu frischem nicht gelitten hatte. Sodann gingen wir so vor, daß an den Versuchstagen, an denen also verschiedene Patientenseren mit beiden Komplementarten vergleichsweise untersucht wurden, immer gleichzeitig eine Titration sowohl des frischen wie des Trockenkomplementes durchgeführt wurde. Die Ergebnisse dieser Versuche finden sich in der großen Tabelle I zusammengestellt, auf deren linker Seite die Titrationen, auf deren rechten Seite die dazu gehörigen Wassermann-Reaktionen wiedergegeben sind. In 28 Versuchen wurden auf diese Weise insgesamt 154 Seren nach Wassermann untersucht und gleichzeitig 28 Komplementtitrationen durchgeführt. Diesen letzten wollen wir uns nun zunächst zuwenden.

Tabelle I.

Ausfall der Titrationen und der Wassermann-Reaktionen mit frischem und dem Trockenkomplement.

Versuch	Titration		Nr.	Wassermann	
	Frisches Komplement	Trockenkompl.		Frisches Komplement	Trockenkomplement
Nr. 1	1/10 gelöst	gelöst	2579	negativ	negativ
	1/20 Spur Hemmung	„	2580	„	„
	1/40 Hemmung	Hemmung	2581	„	„
	1/80 „	„	2582	„	„
			2583	zweifelhaft ±	„
Nr. 2	0,1 gelöst	gelöst	2584	stark positiv ++++	stark positiv ++++
	0,08 „	„	2585	negativ	negativ
	0,06 „	„	2586	„	„
	0,04 Spur Hemmung	Spur Hemmung	2587	„	„
	0,02 „ „	„ „	2588	„	„
			2589	„	„
			2590	zweifelhaft ++	zweifelhaft ++
			2591	stark positiv ++++	stark positiv ++++
Nr. 3	0,1 gelöst	gelöst	2592	negativ	negativ
	0,08 „	„	2593	„	„
	0,06 „	„	2594	„	„
	0.04 „	„	2595	„	„
	0,02 Hemmung	Hemmung	2596	„	„
			2597	„	„
Nr. 4	0,1 gelöst	gelöst	2598	negativ	negativ
	0,08 „	„	2599	„	„
	0,06 „	„	2600	zweifelhaft ±	„
	0,04 Spur Hemmung	„	2601	stark positiv ++++	stark positiv ++++
	0,02 Hemmung	Hemmung	2602	negativ	negativ
			2603	„	„
			2604	„	„
			2605	zweifelhaft ±	„
Nr. 5	0,1 gelöst	gelöst	2611	negativ	negativ
	0,08 „	„	2612	„	„
	0,06 „	„	2613	„	„
	0,04 Spur Hemmung	„	2614	„	„
	0,02 Hemmung	Hemmung	2615	„	„
			2616	„	„
Nr. 6	0,1 gelöst	gelöst	2617	negativ	negativ
	0,08 „	„	2618	„	„
	0,06 „	„	2619	„	„
	0,04 Hemmung	Hemmung	2620	„	„
	0,02 „	„	2621	zweifelhaft ±	„
			2622	negativ	„
			2623	stark positiv ++++	stark positiv ++++
Nr. 7	0,1 gelöst	gelöst	2624	negativ	negativ
	0,08 „	„	2625	zweifelhaft ±	zweifelhaft ±
	0,06 „	„	2626	„ ±	negativ
	0,04 Hemmung	Hemmung	2627	„ ±	„
	0,02 „	„	2628	negativ	„
Nr. 8	0,1 gelöst	gelöst	2655	stark positiv ++++	stark positiv ++++
	0,08 „	„	2656	negativ	negativ
	0,06 „	„	2657	Eigenhemmung	Spur Eigenhemmung
	0,04 Hemmung	„	2658	negativ	negativ
	0,02 „	Hemmung			

Versuch	Titration		Nr.	Wassermann	
	Frisches Komplement	Trockenkompl.		Frisches Komplement	Trockenkomplement
Nr. 9	0,1 gelöst	gelöst	2668	negativ	negativ
	0,08 „	„	2669	„	„
	0,06 „	„	2670	„	„
	0,04 „	„	2671	„	„
	0,02 Spur Hemmung	Spur Hemmung	2672	zweifelhaft ++	zweifelhaft ±
Nr. 10	0,1 gelöst	gelöst	2674	negativ	negativ
	0,08 „	„	2675	stark positiv ++++	stark positiv ++++
	0,06 „	„	2676	„ „ ++++	„ „ ++++
	0,04 „	„	2677	„ „ ++++	„ „ ++++
	0,02 Hemmung	Spur Hemmung			
Nr. 11	0,1 gelöst	gelöst	2687	positiv +++	positiv +++
	0,08 „	„	2688	negativ	negativ
	0,06 „	„	2689	„	„
	0,04 „	„			
	0,02 Hemmung	Hemmung			
Nr. 12	0,1 gelöst	gelöst	2699	negativ	negativ
	0,08 „	„	2700	„	„
	0,06 „	„	2701	„	„
	0,04 Hemmung	Spur Hemmung	2702	stark positiv ++++	stark positiv +++±
	0,02 „	Hemmung			
Nr. 13	0,1 gelöst	gelöst	2720	stark positiv ++++	stark positiv ++++
	0,08 „	„	2721	negativ	negativ
	0,06 „	„	2722	„	„
	0,04 „	Spur Hemmung			
	0,02 Hemmung	Hemmung			
Nr. 14	0,1 gelöst	gelöst	2741	zweifelhaft ±	negativ
	0,08 „	„	2742	negativ	„
	0,06 „	„	2743	„	„
	0,04 „	„	2744	Eigenhemmung	schwache Eigenhemmg
	0,02 Hemmung	Hemmung			
Nr. 15	0,1 gelöst	gelöst	2754	zweifelhaft ±	zweifelhaft ±
	0,08 „	„	2755	negativ	negativ
	0,06 „	„	2756	stark positiv ++++	stark positiv ++++
	0,04 „	„	2757	„ „ ++++	„ „ ++++
	0,02 Hemmung	Hemmung	2758	negativ	negativ
Nr. 16	0,1 gelöst	gelöst	2760	negativ	negativ
	0,08 „	„	2761	„	„
	0,06 „	„	2762	positiv +++	positiv +++
	0,04 „	„	2763	zweifelhaft ++	negativ
	0,02 Hemmung	Hemmung	2764	stark positiv ++++	stark positiv ++++
			2765	negativ	negativ
Nr. 17	0,1 gelöst	gelöst	2845	negativ	negativ
	0,08 „	„	2846	zweifelhaft ±	„
	0,06 „	„	2847	stark positiv ++++	stark positiv ++++
	0,04 „	„	2848	negativ	negativ
	0,02 Hemmung	Spur Hemmung	2849	positiv +++	positiv +++
			2850	negativ	negativ
Nr. 18	0,1 gelöst	gelöst	2872	negativ	negativ
	0,08 „	„	2873	„	„
	0,06 „	„	2874	positiv +++	positiv +++
	0,04 „	„	2875	negativ	negativ
	0,02 Hemmung	Spur Hemmung	2876	„	„

Versuch	Titration		Nr.	Wassermann	
	Frisches Komplement	Trockenkompl.		Frisches Komplement	Trockenkomplement
Nr. 19	0,1 gelöst	gelöst	2889	positiv +++	positiv +++
	0,08 „	„	2890	negativ	negativ
	0,06 „	„	2891	„	„
	0,04 Hemmung	„	2892	„	„
	0,02 „	Hemmung	2893	„	„
			2894	„	„
Nr. 20	0,1 gelöst	gelöst	2905	zweifelhaft ±	negativ
	0,08 „	„	2906	„ ±	„
	0,06 „	„	2907	negativ	„
	0,04 Hemmung	„	2908	„	„
	0,02 „	Hemmung	2909	„	„
			2910	„	„
Nr. 21	0,1 gelöst	gelöst	2914	zweifelhaft ±	negativ
	0,08 „	„	2915	negativ	„
	0,06 „	„	2916	„	„
	0,04 „	„	2917	stark positiv ++++	stark positiv ++++
	0,02 Hemmung	Spur Hemmung	2918	negativ	negativ
			2919	„	„
			2921	Eigenhemmung	Eigenhemmung
			2922	negativ	negativ
			2923	„	„
			2924	„	„
			2925	zweifelhaft ±	„
			2927	stark positiv ++++	stark positiv ++++
Nr. 22	0,1 gelöst	gelöst	2929	negativ	negativ
	0,08 „	„	2930	„	„
	0,06 „	„	2931	„	„
	0,04 Spur Hemmung	Spur Hemmung	2932	zweifelhaft ±	zweifelhaft ±
	0,02 Hemmung	Hemmung	2933	negativ	negativ
			2934	zweifelhaft ±	zweifelhaft ±
Nr. 23	0,1 gelöst	gelöst	2936	stark positiv ++++	stark positiv ++++
	0,08 „	„	2937	negativ	negativ
	0,06 „	„			
	0,04 „	„			
	0,02 Hemmung	Hemmung			
Nr. 24	0,1 gelöst	gelöst	2954	negativ	negativ
	0,08 „	„	2955	„	„
	0,06 „	„	2956	„	„
	0,04 „	Spur Hemmung			
	0,02 „	„ „			
Nr. 25	0,1 gelöst	gelöst	2958	negativ	negativ
	0,08 „	„	2959	„	„
	0,06 „	„	2960	Eigenhemmung	Eigenhemmung
	0,04 „	„	2961	negativ	negativ
	0,02 Hemmung	Spur Hemmung			
Nr. 26	0,1 gelöst	gelöst	2963	Eigenhemmung	Eigenhemmung
	0,08 „	„	2964	negativ	negativ
	0,06 „	„	2965	„	„
	0,04 „	„	2966	„	„
	0,02 Hemmung	Spur Hemmung	2967	stark positiv ++++	stark positiv ++++
			2968	negativ	negativ
			2969	„	„

Versuch	Titration		Nr.	Wassermann	
	Frisches Komplement	Trockenkompl		Frisches Komplement	Trockenkomplement
Nr. 27	0,1 gelöst	gelöst	2972	negativ	negativ
	0,08 „	„	2973	„	„
	0,06 „	„	2974	„	„
	0,04 „	„	2975	„	„
	0,02 Hemmung	Hemmung	2976	„	„
			2977	„	„
			2978	„	„
Nr. 28	0,1 gelöst	gelöst	3979	negativ	negativ
	0,08 „	„	2980	„	„
	0,C6 „	„	2981	„	„
	0,04 Spur Hemmung	„	2982	„	„
	0,02 Hemmung	Hemmung	2983	„	„
			2984	„	„
			2985	„	„

I.
Die Ergebnisse der Titrationen.

Die Titrationen der beiden Komplementsorten wurde nun gleicherweise in folgender Art durchgeführt: Nachdem ein abgewogener Teil des Trockenkomplementes in der vorgeschriebenen Weise mit der neunfachen Menge destillierten Wassers gelöst war, ist die Originalkonzentration des Meerschweinchenserums wieder erreicht. Dieses aufgelöste Komplement wurde ebenso wie das frischgewonnene auf das 10fache mit Kochsalzlösung verdünnt. Ebenso wie im korrespondierenden Wassermann-Versuch wurde dann mit Vierteldosen der Versuch durchgeführt, doch ist in der Tabelle der Uebersichtlichkeit halber der Titer auf ganze Dosen berechnet dargestellt. In diesen Volldosen wurden nun die Titrationen in jedem Fall in folgender fallender Reihe ausgeführt: 0,1—0,08—0,06—0,04—0,02. Mit Ausnahme des ersten Versuches, wo die Verdünnungen 1:10—1:20—1:40—1:80— betrugen. In den übrigen 27 Versuchen fiel 19mal die Titration der beiden Komplemente vollständig gleich aus, bei dem Rest von 8 Titrationen erwies sich 6mal das Trockenkomplement als stärker lösend, 2mal als weniger lösend wie das frische Komplement, so daß aus diesen Titrationsversuchen zum mindesten gefolgert werden kann, daß das Trockenkomplement an Wirksamkeit nicht hinter dem frischen zurücksteht. Die lösende Dosis lag meistens zwischen 0,06 und 0,04, in einigen Fällen auch zwischen 0,04 und 0,02.

In den oben erwähnten differierenden Fällen handelte es sich jedesmal um die Dosis 0,04, die bei dem einen Komplement noch Lösung brachte, bei dem andern nicht. Eine längere Lagerung des Trockenkomplements hatte auf seine Wirksamkeit keinen Einfluß. Angebrochene Fläschchen bewahrten wir immer im luftverdünnten Raume mit Wasserdampfabsorption, wie vorgeschrieben, auf.

II.
Die Ergebnisse der Wassermann-Reaktionen.

Wie schon oben gesagt, wurden insgesamt 28 Vergleichsversuche angestellt. Die Gesamtzahl der in diesen Versuchen untersuchten Patientenseren betrug 154. Wir gingen so vor, daß die Sera, wie sie uns

eingeliefert wurden, sowohl mit frischem wie mit Trockenkomplement zur Wassermannschen Reaktion angesetzt wurden; jedes wurde also doppelt untersucht. Außer dem jeweiligen Komplement waren die übrigen Reagentien jedesmal die gleichen, sie bestanden aus 3 staatlich geprüften Extrakten: einem Hammelblutambozeptor, meistens mit dem Titer 1:3000 bis 4000, und der 5proz. Hammelblutaufschwemmung. Dieses hämolytische System war natürlich dasselbe wie in dem korrespondierenden Komplementtitrationsversuch. Das frische Komplement war jedesmal kurz vor den Versuchen lebenden Meerschweinchen aus dem Herzen entnommen. Die Technik war die Originalmethode v. Wassermanns, aber ausgeführt mit Vierteldosen. Nach Beendigung der Reaktion wurde dieselbe abgelesen und mit den gleichen Kreuzbezeichnungen notiert.

Es bedeutet:

++++ vollständige Hemmung der Hämolyse: sehr stark positiv,
+++ fast vollständige Hemmung der Hämolyse: positiv,
++ etwa zur Hälfte gehemmt: zweifelhaft,
± Spur Hemmung: sehr zweifelhaft.

Die Ergebnisse ++++ und +++ sind bekanntlich für Lues beweisend, die übrigen nicht. Es sei noch bemerkt, daß die 3 Antigene ziemlich gleichmäßig arbeiteten und daß demgemäß Differenzen bei den einzelnen Extrakten während unserer Versuche nicht beobachtet wurden.

Wie aus Tabelle I zu ersehen ist, waren nun die Ergebnisse der vergleichenden Untersuchung dieser 154 Seren wie folgt:

23 positive ++++ und +++,
19 zweifelhafte ++ und ±,
3 Eigenhemmungen,
109 negative.

Die 23 positiven Ergebnisse waren mit beiden Komplementen immer gleichstark positiv. Ebenso verhielt es sich bei den 109 negativen und den 3 Eigenhemmungen. Es kam also nicht ein einziges Mal vor, daß ein Wassermann mit dem einen Komplement stark positiv und mit dem andern negativ war, oder mit dem einen Eigenhemmung gehabt hätte, mit dem andern nicht. Wohl aber ergaben sich bemerkenswerte Differenzen bei den zweifelhaften Fällen. Von diesen 19 waren nämlich nur 6 mit beiden Komplementen ++ oder ±, 13 dagegen waren mit dem frischen Komplement zweifelhaft, mit dem Trockenkomplement dagegen negativ. Diese auffällige Erscheinung bedurfte der Aufklärung. Es war gewiß von vornherein nicht zu erhoffen, vollständig klare Verhältnisse zu schaffen, sind doch diese zweifelhaften von jeher die Crux medicorum gewesen, viele Praktiker pflegen dieselben ja überhaupt nicht zu beachten. Trotzdem versuchten wir durch Umfrage bei den Einsendern möglichst viel Licht in die zweifelhaften Fälle zu bringen. Die Resultate sind in den Tabellen II und III zusammengestellt. Die Betrachtung der differenten Fälle, die 13 umfassen, ergibt nun folgendes (s. Tab. II u. III, S. 183).

Ueber einen von ihnen konnten wir keine näheren Auskünfte erlangen. Von den 12 übrigen waren 6 sichere Luesfälle, 3 Fälle zweifelhaft und 3 ziemlich sicher keine Luesfälle. Wenn wir also von dieser Gruppe aus die Angelegenheit betrachten, so müssen wir feststellen, daß ohne das frische Komplement 6 sichere Fälle der Diagnose entgangen sind. Allerdings handelt es sich bei diesen sechsen

Tabelle II.

Fälle zweifelhafter Reaktion mit ungleichem Ausfall bei den verschiedenen Komplementen.

Nr.	Ausfall				Bemerkungen zu der Art der Fälle
	1) Frisches Komplement		2) Trockenkomplement		
	a) Ausfall d. Reakt.	b) Titer d. Kompl.	a) Ausfall d. Reakt.	b) Titer d. Kompl.	
2583	±	$^1/_{10}$—$^1/_{20}$	—	$^1/_{20}$	Behandelter Luesfall mit Erscheinungen.
2600	±	0,06	—	0,04	Keine Lues festgestellt, Netzhauterkrankung. Arteriosklerose, beim zweiten Mal WaR. negativ.
2605	±		—		Keine sichere Lues. Mann der Patientin an Lues erkrankt.
2621	±	0,06	—	0,06	Sichere alte Lues, behandelt, gegenw. Erscheinung: Pupillenlähmung.
2626	±	0,06	—	0,06	Keine sichere Lues, nur Infektionsmöglichkeit vor 8 Wochen. Dauernd nachher ohne Erscheinungen.
2627	±		—		Mutter angeblich Lues. Bei der Patientin keine Zeichen, keine Behandlung.
2741	±	0,04	—	0,04—2	Beginnende Tabes?? Erscheinungen von Lues nie beobachtet. Mann an Taboparalyse erkrankt.
2763	++	0,04	—	0,04	Skleradenitis und 2 Fehlgeburten. Salvarsankur.
2846	±	0,04	—	0,04	Keine Auskunft zu erhalten.
2905	±	0,06	—	0,04	Primäre Lues. 14. 1. 24. Spirochäten positiv. 25. 4. WaR. schwach positiv. Diese Reaktion am 27. 5.
2906	±		—		Iritis mit Salvarsan geheilt.
2914	±	0,04	—	0,04—2	Späterer WaR. +++. Nervöse Beschwerden auf Hg. gebessert.
2925	±		—		Nur Lidsenkung, keine sichere Lues, keine spezielle Behandlung.

Insgesamt 13 Fälle: 6 sichere Luesfälle: 2583, 2621, 2763, 2905, 2906, 2914,
3 Fälle zweifelhaft: 2605, 2626, 2741,
3 ziemlich sicher keine Lues: 2600, 2627, 2925.
1 Fall ohne Auskunft: 2846.

Tabelle III.

Fälle zweifelhafter Reaktion und **gleichem** Ausfall bei den verschiedenen Komplementen.

Nr.	Ausfall				Bemerkungen zu der Art des Falles
	1) Frisches Komplement		2) Trockenkomplement		
	a) Ausfall d. Reakt.	b) Titer d. Kompl.	a) Ausfall d. Reakt.	b) Titer d. Kompl.	
2590	++	0,06	++	0,06	Sichere Lues. Das erste Mal WaR. ++++. Diese R. nach einer Salvarsankur.
2625	±	0,06	±	0,06	Sichere Lues, seit Mai 1921 behandelt.
2672	++	0,04	±	0,04	Einzelheiten nicht zu ermitteln.
2754	±	0,04	±	0,04	Iritis, wahrscheinlich keine Lues, sondern Tb.
2932	±	0,06	±	0,06	Mann luetisch, Frau ?
2934	±		±		Sichere Lues seit 10 Jahren, jetzt gastrische Erscheinungen.

6 Fälle: 1 nicht zu ermitteln: 2672.
3 sichere Lues: 2590, 2625, 2934.
2 fragliche Lues: 2754, 2932.

4mal um behandelte Fälle, 1mal um eine beginnende Lues (2914), denn später wurde der Wassermann positiv, und nur 1mal um eine Iritis, über die wir keine Auskunft über die Vorgeschichte erlangen konnten. Andererseits finden sich in dieser Gruppe 3 Fälle, die nur bei Verwendung des frischen Komplementes in Luesverdacht geraten, ohne daß sonst sichere Gründe dafür sprechen. Wie steht es nun mit der Gruppe, wo mit beiden Komplementen zweifelhafte Reaktion auftrat?

Unter den hierzu gehörigen 6 Fällen war von einem wieder nichts zu ermitteln. Bei dreien lag sicher Lues vor. Auch hier handelt es sich um behandelte Fälle. Die restlichen 2 Fälle waren fragliche Luesfälle. Bei dem einen lag eine Iritis vor, über die eine Entscheidung nicht zu fällen war. Der behandelnde Arzt behandelte zunächst mit Salvarsan, später auf Tb. Der andere Fall betraf die Frau eines sicher luetischen Mannes und wurde von dem behandelnden Arzt als eine „abgeschwächte Infektion" angesehen. In dieser Gruppe sind also so starke Differenzen der Fälle nicht zu beobachten, wie in der vorhergehenden. Wenn wir also eine Beurteilung versuchen wollen, so sind wir mehr auf die 1. Gruppe angewiesen.

Das Wichtigste in dieser ist nun, daß 6 Luesfälle mit dem Trockenkomplement nicht erfaßt wurden. Man könnte nun die Vermutung haben, daß die in den Titrationsversuchen festgestellte stärkere Lösungskraft des Trockenkomplementes an diesem Ausfall schuld sein könnte. Da wir jedoch bei jedem Versuch eine Titration ausgeführt haben, so läßt sich diese Frage beantworten. Es ergibt sich bei der Vergleichung der angewandten Komplemente (Tabelle II) die Tatsache, daß bei 4 dieser 6 Fälle die Titer der Komplemente ungleich gewesen sind. Andererseits sind bei den Fällen der Tabelle III die Titer der Komplemente jedesmal vollständig gleich. Die mehr oder weniger große Fermentmenge in den beiden Komplementen könnte also wohl der Grund dieser Erscheinung sein. Man hätte noch Versuche anstellen können, ob durch Herabsetzung der Trockenkomplementmenge die negative Reaktion sich verändert hätte. Aus äußeren Gründen sind jedoch solche Versuche unterblieben.

Es darf nun nicht übersehen werden, daß wir in der Tabelle II 3 Fälle fanden, die mit frischem Komplement sehr zweifelhaft reagierten, ohne daß in diesen Fällen begründeter Verdacht einer Lues vorliegt. Wenn bei diesen Fällen das Trockenkomplement einen negativen Ausfall brachte, und wenn diese Art Fälle in der Tabelle III vollständig ausfiel, so ist das im Interesse der Sicherheit der Wassermannschen Reaktion nur durchaus zu begrüßen. Allerdings müssen wir hierbei stark unterstreichen, daß zur vollständigen Klärung dieser Frage unser vorgelegtes Material bei weitem nicht genügt, und daß umfassende Erhebungen in dieser Frage notwendig sind.

Trotzdem sind wir der Meinung, daß die vorgelegten Resultate die Brauchbarkeit des Trockenkomplementes für die Praxis in der Wassermannschen Reaktion erwiesen haben. Der Ausfall der sechs zweifelhaften unter 154 Untersuchungen wird zum Teil kompensiert durch die Tatsache, daß es sich um behandelte Fälle handelte. Wissen wir doch, daß bei diesen sich Schwankungen der Reaktion immer finden. Handelt es sich aber im speziellen Fall um Auffindung der letzten Reste einer positiven Reaktion bei solchen Fällen, so haben wir Möglichkeiten genug, dieselben festzustellen. Daß Bedarf hierzu vorgelegen hat und immer vorliegen wird, zeigt die Tatsache, daß über-

haupt Verfeinerungen an der Wassermannschen Reaktion erdacht und ausprobiert worden sind.

Zusammenfassung.

In einer Reihe von Titrierversuchen erwies sich das Trockenkomplement als ebenso, zum Teil stärker lösend wie das frische Komplement.

In der Ausprobung bei 154 Patientenseren (Wassermann) ergab sich bei den negativen und den sicher positiven keinerlei Differenz zwischen den Reaktionen mit frischem und Trockenkomplement. Einige mit frischem Komplement zweifelhaft ausfallende Reaktionen waren mit Trockenkomplement negativ, doch ergibt die Kritik dieser Fälle, daß dieselben für die Beurteilung des Trockenkomplements nicht ins Gewicht fallen.

Es kann daher geschlossen werden, daß das Trockenkomplement zur Anstellung der Wassermannschen Reaktion mit Erfolg verwendbar ist.

Untersuchungen über das Verhältnis der Geflügelpocken zur Vakzine.

[Aus dem Institut zur Erforschung der Infektionskrankheiten in Bern (Direktor: Prof. Dr. G. Sobernheim).]

Von Dr. **Waldemar Loewenthal** (Bern), Dr. **Y. Kadowaki** und Dr. **S. Kondo** aus Japan.

Mit 5 Abbildungen im Text.

Die Beziehungen mancher Tierpocken zur Variola des Menschen sind schon vielfach erörtert worden, und auch heute noch sind nicht alle Fragen geklärt. Der Zusammenhang freilich zwischen Vakzine- und Variolavirus sowie auch gewisser Formen der Mauke des Pferdes, von denen Jenner die Kuhpocken ableitete, lag schon zu Jenners Zeit auf der Hand. Dennoch aber bedurfte es umfangreicher Untersuchungen, um diesen Zusammenhang zu beweisen, und es kann heute kaum noch ernstlich bezweifelt werden, daß Vakzine und Variola durch denselben Krankheitserreger bedingt sind. Auch für die anderen Säugetierpocken (Schaf, Schwein, Ziege) ergibt sich, namentlich aus den neueren Untersuchungen von Gins, der auf dem Umweg über das Kaninchen die Affektionen auf das Rind übertrug und so zur Vakzine gelangte, wohl ohne weiteres der Schluß, daß sie lediglich eine an die betreffenden Tierarten angepaßte Variola sind.

Am entgegengesetzten Ende der Reihe stehen die entfernt pockenähnlichen Erkrankungen der Kaltblüter. Für diese, die mit charakteristischen, einschlußartigen Veränderungen im Kern der Epithel-

zellen einhergehen [Karpfenpocke (Loewenthal), Lippenseuche der Barben (Keysselitz), Hauttumoren von Fröschen (Sanfelice)], sind bisher nähere Beziehungen zur Variola bzw. Vakzine nicht angenommen worden.

Eine Mittelstellung nehmen die Geflügelpocken ein. Diese Krankheit soll früher (vgl. Hutyra u. Marek) für identisch mit den Säugetierpocken gehalten worden sein, bis Spinola (1858) und Bollinger (1873) diese Ansicht hauptsächlich wegen des Versagens der kreuzweisen Uebertragung als widerlegt betrachteten. Die späteren Untersuchungen über Geflügelpocken wandten sich im wesentlichen anderen Fragen zu (Morphologie, Erreger, Immunität, Beziehung zur Geflügeldiphtherie), und nur Reischauer kam auf den engeren Zusammenhang wieder zurück. Er bezeichnete die in der Geflügelpocke zu beobachtenden charakteristischen Zelleinschlüsse, trotz ihrer mikrochemisch abweichenden Beschaffenheit, ungescheut als Guarnierische Körperchen, identifizierte sie also mit den bei Variola und Vakzine bekannten entsprechenden Gebilden. Im Jahre 1915 nahm dann von Betegh die Tatsache, daß ihm die Uebertragung der Schafpocke auf das Huhn gelungen war, zum Anlaß, einen näheren Zusammenhang oder, wie Hutyra und Marek angeben, sogar die Identität von Geflügel- und Säugetierpocken zu vertreten mit Gründen, die eine wohl von niemandem bezweifelte Verwandtschaft, nicht aber einen gemeinsamen Erreger oder Ueberführung einer Form in die andere beweisen konnten. In den letzten Jahren hat nun van Heelsbergen Untersuchungen veröffentlicht in der ausgesprochenen Absicht, die „ursprünglichen Auffassungen einigermaßen in Ehren wiederherzustellen“. Es muß daher auf seine Veröffentlichungen etwas näher eingegangen werden.

Zunächst berichtet van Heelsbergen, daß er durch Einreiben von frischem Material von Geflügelpocke (Huhn) in die Haut beim Kaninchen starke, konfluierende Eruptionen erhielt, die sich von Kaninchen zu Kaninchen übertragen ließen; in der 4. Kaninchengeneration kam es zur Bildung typischer Pusteln mit Delle. Ebenso gelang die Uebertragung vom Huhn auf Kalb und Rind unter Auftreten typischer Pockenpusteln. Durch Kaninchenpassage wird die Virulenz für das Kalb gesteigert. Andererseits erzeugte er mit Vakzinevirus auf dem Kamm von Hühnern typische Pockeneruptionen, die er genau dem Bilde gleichend fand, wie man es zuweilen bei Geflügelpocken sieht. Die auf dem Kamm mit Vakzine geimpften Hühner erwiesen sich bei der Nachimpfung mit Geflügelpocken am Kamm als mehr oder weniger vollständig immun, nach Vakzinierung der Brusthaut aber entwickelte sich am Kamm keine Immunität gegen Geflügelpocken, ein Verhalten, das der Autor als Lokalimmunität aufzufassen geneigt ist[1]). Hühner dagegen, die Geflügelpocken überstanden hatten, waren für Vakzine voll empfänglich. Ferner konnte van Heelsbergen durch Einreiben von Geflügelpocke in die Schleimhaut der Oberlippe beim Pferd ein Krankheitsbild erzeugen, das mit dem der Stomatitis pustulosa contagiosa des Pferdes übereinstimmte. In den Schlußsätzen sagt Verfasser weiter: „Die Zelleinschlüsse, welche bei Geflügelpocken gefunden werden, stimmen mit denen überein, welche durch das Vakzinevirus zum Vorschein gerufen werden“. Eine Unterlage für diese Angabe ist in der (offenbar gekürzten) deutschen Ausgabe nicht enthalten: die ausführliche holländische Arbeit ist hier nicht zugänglich und konnte auch durch den Autor selbst nicht erhalten werden. In einer zweiten Veröffentlichung, in der er die enge Zu-

1) Es ist offenbar dasselbe Verhalten, wie Loewenthal es bei der Taubenpocke beobachtet hat: Immunität der Lider einer Seite nach Impfung der anderseitigen, aber keine Lidimmunität nach Impfung der Brusthaut. Loewenthal hat daraus nicht auf lokale Immunität geschlossen, sondern auf ungenügende Immunisierung infolge leichteren Krankheitsverlaufes bei Impfung mit Vermeidung der Prädilektionsstellen.

sammengehörigkeit von Vakzine und Stomatitis contagiosa equi mit guten Gründen weiter belegt, berichtet der Autor über gelungene Infektionen von Hühnern mit Stomatitisvirus vom Pferd. Es entstanden auf dem Kamm der Hühner Pocken, die mit den gewöhnlichen Geflügelpocken übereinstimmten; die Erkrankung war schwerer als nach Vakzineimpfung und in einzelnen Fällen tödlich. Im Gegensatz zur Vakzine schützte aber das Ueberstehen der Stomatitisinfektion Hühner nicht gegen Geflügelpocken.

Die Uebertragbarkeit von Vakzine auf das Huhn ist von Levaditi und Nicolau bestätigt und zu wichtigen Versuchen nutzbar gemacht worden; diese Autoren berichten auch von einem Kaninchen, das sie an der Haut mit Virus der Geflügelpocke infizieren konnten. Wegen des Ausbleibens der wechselseitigen Immunität erklären Levaditi und Nicolau die beiden Vira für verschieden.

Neuerdings, als die vorliegenden Untersuchungen dem Abschluß nahe waren, ist eine Veröffentlichung von Toyoda aus dem Berliner Institut für Infektionskrankheiten erschienen, die denselben Standpunkt vertritt wie van Heelsbergen. Toyoda hat Geflügelpocken (es ist nicht deutlich, ob Hühner- oder Taubenpocken) mit Erfolg auf Kaninchen und Meerschweinchen übertragen und damit Affektionen erzeugt, die von Vakzine nicht zu unterscheiden waren. Mit solchen durch das Kaninchen passierten Geflügelpocken hat er auch bei Impfung von Mensch und Lamm Vakzinepusteln erhalten. Die erfolgreiche Impfung mit Geflügelpocken schützte gegen Vakzine. Toyoda zieht aus seinen Untersuchungen den Schluß, die Umwandlung des Geflügelpockenvirus in Vakzine sei bewiesen, und er sieht die in der Natur selbständig vorkommenden Pockenarten als abgesprengte Varietäten derselben Pockenseuche an; und zwar nimmt er an, daß sie sich von den Menschenpocken abgespalten haben.

Zur Klärung der Frage, ob Vakzine und Geflügelpocken einander sehr nahe stehen oder gar durch denselben Erreger erzeugt werden, stehen von vornherein 2 Wege zur Verfügung: Untersuchungen über das klinische und mikroskopische Verhalten bei Uebertragung von einer Tierart auf die andere oder immunologische Prüfungen. Wir haben beide Wege eingeschlagen.

A. Uebertragung von Vakzine auf Geflügel.

Rückübertragung auf das Kaninchen. (Loewenthal und Kadowaki).

a) Infektionsversuche.

Daß die Vakzine auf Geflügel, insbesondere auf Hühner übertragbar ist, ist eine uns heute geläufige Kenntnis. Das war nicht immer so. War doch gerade die behauptete Unmöglichkeit, Vakzine auf Vögel (und Geflügelpocken auf Säugetiere) zu übertragen, der Grund für Spinola wie für Bollinger, die bis dahin geltende Annahme der Identität beider Affektionen abzulehnen. Auch v. Prowazek führt noch in seinem Handbuch der pathogenen Protozoen (1912) im Text nur Autoren an, denen die Uebertragung von Vakzine auf Hühner und Tauben nicht gelungen ist und die deshalb diese Tiere für unempfänglich halten, und erst in einer Anmerkung bei der Korrektur kann die entgegengesetzte Behauptung mitgeteilt werden, daß nämlich nach Casagrandi das Huhn für den Nachweis kleinster Virusmengen besonders geeignet sei.

Zur Vakzineimpfung benutzten wir die sehr wirksame Glyzerinlymphe des Schweizer Serum- und Impfinstituts ohne weitere Verdünnung. Als Impftiere dienten Tauben und Hühner. In einer 1. Versuchsreihe wurde bei 3 Tauben die Lymphe in die gerupfte und skarifizierte Brusthaut, in die skarifizierte Haut der Augenlider und in die skarifizierte Mundschleimhaut eingerieben, ferner in die geritzten Corneae. Augenlider und Mundschleimhaut wurden gewählt, weil diese ja bei spontaner Taubenpocke mit Vorliebe befallen werden. Bei einwöchiger Beobachtung konnte makroskopisch nichts gefunden werden, was auch nur im entferntesten eine Deutung als positiver Impferfolg gestattet hätte, sondern es trat nichts anderes auf, als die normale, geringfügige Verletzungsreaktion. In einem zweiten Versuch wurden 4 weitere Tauben in die skarifizierte Haut der Augenlider geimpft, eines der Tiere wieder ganz ohne Erfolg. Bei den 3 anderen Tieren entwickelte sich 3 Tage nach der Impfung an je 1 Lid eine gut stecknadelkopfgroße, leicht erhabene Papel, die in 1 Fall nach 2 Tagen, im 2. nach 3 Tagen wieder verschwunden war. Das letzte Tier, bei dem die Papel am 3. Tage noch bestand, wurde zwecks histologischer Untersuchung getötet.

Angesichts dieser kümmerlichen Impferfolge wurde von einer weiteren Verwendung von Tauben abgesehen und fernerhin nur an Hühnern gearbeitet. Glyzerinlymphe wurde insgesamt auf 9 Hühner verimpft, und zwar bei sämtlichen Hühnern auf Kamm und Kehllappen, bis auf 1 Tier, bei dem die Kehllappen nicht geimpft wurden. 6 Tiere wurden auch in die skarifizierte Haut der Augenlider geimpft, 4 gleichzeitig an der Brusthaut und an der Mundschleimhaut, und bei 3 Tieren wurde überdies noch eine Corneaimpfung vorgenommen. Die beste Impfstelle ist offenbar der Kamm, denn hier zeigten alle Tiere bis auf 1 eine mehr oder weniger gute Impfreaktion, während von den 8 Impfungen am Kehllappen nur 4 angingen, und zwar schwächer als am Kamm. Ebenso ungünstig erwies sich die Haut der Augenlider, die ebenfalls nur in der Hälfte der Fälle schwach reagierte, und von den 4 Impfungen an der Brusthaut verliefen 3 ergebnislos. Von den Impfungen auf Mundchleimhaut und Cornea ließ keine einzige eine spezifische Reaktion erkennen. 1 Huhn reagierte an keiner der 6 Impfstellen.

Der Impferfolg am Kamm zeigte sich nach 2—5, zumeist nach 3 Tagen in Form submiliarer und miliarer, manchmal auch etwas größerer weißlich-gelber Knötchen, die sich zum Teil schnell zu einer kleinen Pustel entwickelten ohne deutliche Delle; es trat dann bald Krustenbildung ein und in wenigen Tagen war die ganze Affektion abgeheilt. Selbst am Kamm handelt es sich also um eine schwache und wenig charakteristische Reaktion, und daß, wie Casagrandi angibt, das Huhn für den Nachweis kleinster Mengen von Vakzinevirus besonders geeignet sei, trifft nach unseren Erfahrungen nicht zu.

Die Hauptfrage war aber für uns, wie sich das Vakzinevirus bei der Weiterimpfung verhält, ob es sich insbesondere an das Huhn anpaßt und für die Tiere virulenter wird. Es wurde deshalb in 7 Fällen das meist geringe Material der Vakzineeffloreszenzen von den Hühnern der ersten Generation auf insgesamt 8 neue Hühner verimpft. In 1 Fall zeigte das Tier der 2. Impfgeneration keinerlei Erscheinungen, bei den 7 übrigen Hühnern gelang die Uebertragung. Ausnahmslos aber war der Impferfolg schlechter als bei den Tieren, von denen das Material gewonnen war und die mit Glyzerinlymphe geimpft gewesen

waren; daß auf dem geimpften Kamm 3 Papeln zur Entwicklung kamen, gehörte zu den Ausnahmen. Da nun das Material auch histologisch untersucht werden sollte, wurde meist von weiterer Uebertragung abgesehen und nur 1 Versuch über mehrere Generationen fortgeführt. Die folgende Uebersicht diene zur Erläuterung dieser Versuchsreihe:

Glyzerinlymphe → Huhn 5

Huhn 5 → Kaninchen 1

Huhn 5 → Huhn 7 → Huhn 9 → Huhn 10 → Huhn 12

Huhn 9 → Kaninchen 2 → Huhn 11 → Huhn 13 → Huhn 14 → Huhn 15 → Huhn 16

Huhn 15 → Kaninchen 3

Hier wurde also die Ueberimpfung von Huhn zu Huhn in 5 Generationen fortgeführt und hätte vielleicht noch über einige weitere Generationen fortgesetzt werden können, obwohl die Abnahme der Virulenz deutlich war und sich auch in der Inkubationszeit äußerte. Diese betrug nämlich bei Huhn Nr. 5 = 2 Tage, bei Nr. 7 und 9 = 3 Tage, bei Nr. 10 = 5 und bei Nr. 12 = 4 Tage. Von Huhn 9 war zugleich eine Rückimpfung auf das Kaninchen vorgenommen worden, von dessen Hauteffloreszenzen wieder Hühnerpassagen ausgingen, beginnend mit Huhn Nr. 11. Auf dem Kamm dieses Huhnes (Nr. 11) entwickelten sich 3 Tage nach der Impfung reichliche konfluierende Pusteln, es war das der stärkste Impferfolg, den wir beim Huhn gesehen haben. In den nächsten Generationen, Huhn Nr. 13 und 14, betrug die Inkubationszeit sogar nur 2 Tage, bei Huhn 15 = 3, bei Huhn 16 schon wieder 4 Tage, und es gelangte nur noch eine einzige miliare Papel zur Entwicklung, von der nicht weiter überimpft wurde.

Dieser Versuch zeigt mit aller Deutlichkeit, daß das Vakzinevirus sich freilich durch einige Generationen auf dem Kamm des Huhnes fortführen läßt, *daß es sich dabei aber nicht an das Huhn anpaßt und etwa die Virulenz der Geflügelpocken erreicht, sondern daß im Gegenteil die Virulenz für das Huhn fortschreitend abnimmt.* Eine eingeschaltete Kaninchenpassage vermag den Impferfolg beim Huhn stark zu verbessern, aber wenige Hühnerpassagen genügen, die Virulenz für das Huhn wieder herabzudrücken. Ob die Virulenz auch für das Kaninchen vermindert ist, vermögen wir nicht zu sagen, da wir quantitative Versuche mit verschiedenen Verdünnungen nicht ausgeführt haben. Jedenfalls rief das Virus auch nach Hühnerpassage bei Kaninchen typische Impfreaktion hervor. Nach der 1. Hühnerpassage (Huhn Nr. 5) hat das Virus auf den Corneae von Kaninchen 1 die für Vakzine charakteristischen Veränderungen ergeben. Ebenso hat das Virus der 3. Hühnergeneration (Huhn 9) beim Kaninchen Nr. 2 typische Keratitis und auf der Haut

Pusteln mit charakteristischer Delle erzeugt. Auch die Corneae von Kaninchen Nr. 3, die mit Virus der 4. Hühnerpassage[1]) (Huhn Nr. 15) geimpft waren, zeigten nach 2 Tagen Fazetten und schon perikorneale Injektion; die Entwicklung der Keratitis wurde nicht abgewartet, weil die Hornhäute histologisch untersucht werden sollten.

Dieser Teil der Untersuchungen vermag also die Annahme eines näheren Zusammenhangs zwischen Geflügelpocke und Vakzine oder die Anschauung, es handle sich um das selbe, nur an verschiedene Tierarten angepaßte Virus, nicht zu stützen.

b) Histologische Untersuchungen.

Das Untersuchungsmaterial wurde in Alkohol oder in Zenkerscher Lösung fixiert und nach Paraffineinbettung annähernd senkrecht zur Hautoberfläche geschnitten. Zur Färbung diente Hämatoxylin-Eosin, eine Färbung, die neben der allgemeinen Brauchbarkeit die Zelleinschlüsse der Geflügelpocke stark eosinrot gefärbt hervortreten läßt, und die Unnasche Färbung (Hämatoxylin-Safranin-Tannin) in der Modifikation von Paul, die sich für die Darstellung der Guarnierischen Körperchen bewährt hat.

Die mikroskopische Untersuchung ergab folgendes: Die Impfeffloreszenzen stellen sich dar (Fig. 1) als stark gekammerte, innerhalb des Epithels liegende Bläschen, sind also ringsum von Epithelzellen eingeschlossen und von Scheidewänden durchzogen, die meist in der Richtung von der Tiefe zur Oberfläche gehen. Das Stratum corneum ist insbesondere an der Kuppe des Bläschens verdickt, sendet auch häufig Zapfen in die Tiefe und ist manchmal von einer homogeneren Schicht überdeckt oder ersetzt (Schorfbildung). In den Hohlräumen liegen mehr oder weniger zahlreiche Rundzellen. Die an die Epidermis angrenzenden Schichten des Coriums zeigen im Bereich des Bläschens und darüber hinaus starke Rundzelleninfiltration, die Blutgefäße sind strotzend gefüllt. Das Bild entspricht also durchaus einer Vakzine- oder Variolapustel; auch in der Geflügelpocke kommen ja Hohlräume vor, sie hat aber doch nicht so ausgeprägten Bläschencharakter. Pusteln dieser Art haben wir bei mikroskopischer Untersuchung nicht nur in der 1. Hühnerpassage gefunden, sondern in allen Generationen, auch in der 5. Solche Bläschen wurden nicht bei allen mikroskopisch untersuchten Hühnern festgestellt. In anderen Präparaten fanden wir nur eine knötchenartige Rundzelleninfiltration des Coriums mit starker Gefäßfüllung; das Epithel im Bereich des Knötchens war meist nicht wesentlich verdickt (Papelbildung); auch derartige Befunde waren unabhängig von der Zahl der Passagen. Das Allgemeinbild zeigte also keine Annäherung an das Aussehen der Geflügelpocke.

Hiermit stimmte auch der Befund bei Untersuchung mit Oelimmersion überein; in keinem einzigen der zahlreichen genau durchmusterten Präparate der verschiedenen Impfgenerationen war irgend etwas zu finden, was an die für Geflügelpocke charakteristischen Zelleinschlüsse auch nur entfernt erinnert hätte (Fig. 2).

Die Zelleinschlüsse der Geflügelpocke unterscheiden sich von den Guarnierischen Körperchen durch ihre bedeutendere Größe, durch die Häufigkeit stark

1) Die Hühnerpassage ist die 4. nach Einschiebung einer Kaninchenpassage, im ganzen aber die 7.

knolliger Formen und insbesondere durch ihren Gehalt an einer fettartigen Substanz (Osmiumfixierung, Färbung mit Sudan oder Scharlach), die bei der gewöhnlichen Behandlung der Präparate ohne Fettfixierung extrahiert wird, so daß die Einschlüsse eigentümlich durchbrochen erscheinen. Die Unterscheidung auf Grund der Einschlüsse ist freilich nur an einigen Stellen möglich, da diese Einschlüsse nicht überall auftreten. Es ist bekannt, daß bei Geflügelpocke in den inneren Organen keine und auf der Mundschleimhaut nur ausnahmsweise Einschlüsse gefunden werden, in den Pockenaffektionen der äußeren Haut aber sind sie nach allen vorliegenden Untersuchungen regelmäßig vorhanden.

Da nun auf dem Kamm des Huhnes bei Geflügelpocke diese Einschlüsse zu finden sind, so ist durch ihr Fehlen erwiesen, daß Vakzine durch Hühnerpassage sich nicht in Geflügelpocke umwandelt.

Die einzige untersuchte Papel von der Taube zeigte ebenfalls keine Einschlüsse.

Andererseits aber ergab die Untersuchung das bemerkenswerte Resultat, daß in keinem der Präparate von Huhn oder Taube, auch

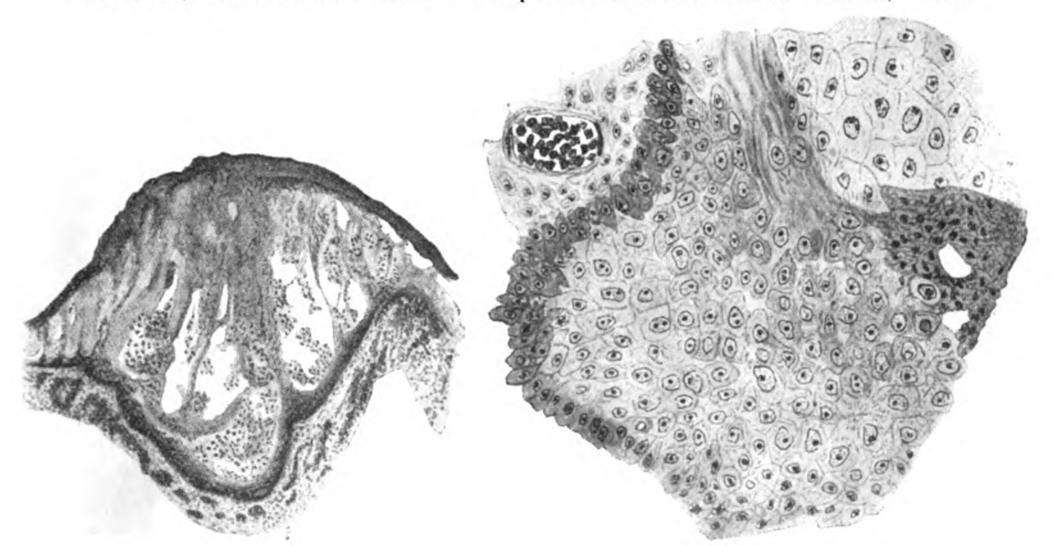


Fig. 1. Fig. 2.

Die Abbildungen sind bei den angegebenen Vergrößerungen mit dem Zeichenapparat entworfen worden; die Reproduktion erfolgt in halber Größe.

Fig. 1. Vakzinepustel vom Kamm von Huhn 28, erste Generation. Gefächerte Pustel innerhalb des Epithels liegend, auf stark infiltriertem, hyperämischem Grund. Uebersichtsbild (Leitz-Ok. 0, Obj. 4).

Fig. 2. Randpartie einer Vakzinepustel vom Kamm des Huhnes 15, 4. Generation. Vergrößerung und Auflockerung der Epithelzellen von der Basalschicht zum Bläschenzentrum hin; völliges Fehlen der für Geflügelpocke charakteristischen Zelleinschlüsse. Färbung Hämatoxylin-Eosin. (Zeiß-Komp.-Ok. 4, Apochromat Imm. 2 mm 1,30).

nicht in Pusteln oder Papeln der ersten Generation, wo sie doch noch am ehesten zu erwarten gewesen wären, Guarnierische Körperchen nachweisbar waren. Als Beispiel diene Fig. 3. Hieraus nun den Schluß zu ziehen, die Affektion des Geflügels sei auch keine Vakzine, ist natürlich nicht zulässig. Denn daß Geflügelpocke beim Geflügel an der äußeren Haut mit Zelleinschlüssen einhergeht, steht zwar fest, ob aber Vakzine beim Geflügel Guarnierische Körper-

chen erzeugt, ist bisher noch nicht bekannt. Levaditi und Nicolau geben über das Verhalten der Guarnierischen Körperchen bei den von ihnen vakzinierten Hühnern nichts an, und Toyoda vermochte beim Huhn nach Impfung mit Schafpocken keine sicheren G. K. zu finden. Aus der Entstehung der Pusteln und Papeln infolge von Verimpfung von Vakzine ist anzunehmen, daß es Vakzinepusteln sind, und wenn Guarnierische Körperchen fehlen, so folgt eben daraus, daß die Vakzine auf dem Kamm des Huhnes ohne Bildung von Guarnierischen Körperchen verläuft. Ueberdies wurde Pustelinhalt von Huhn 15 (4. Generation) auf die Kaninchencornea überimpft; das Kaninchen wurde nach 48 Std. getötet, die mikroskopische Untersuchung der Cornea ergab die bekannte Epithelverdickung und zahl-

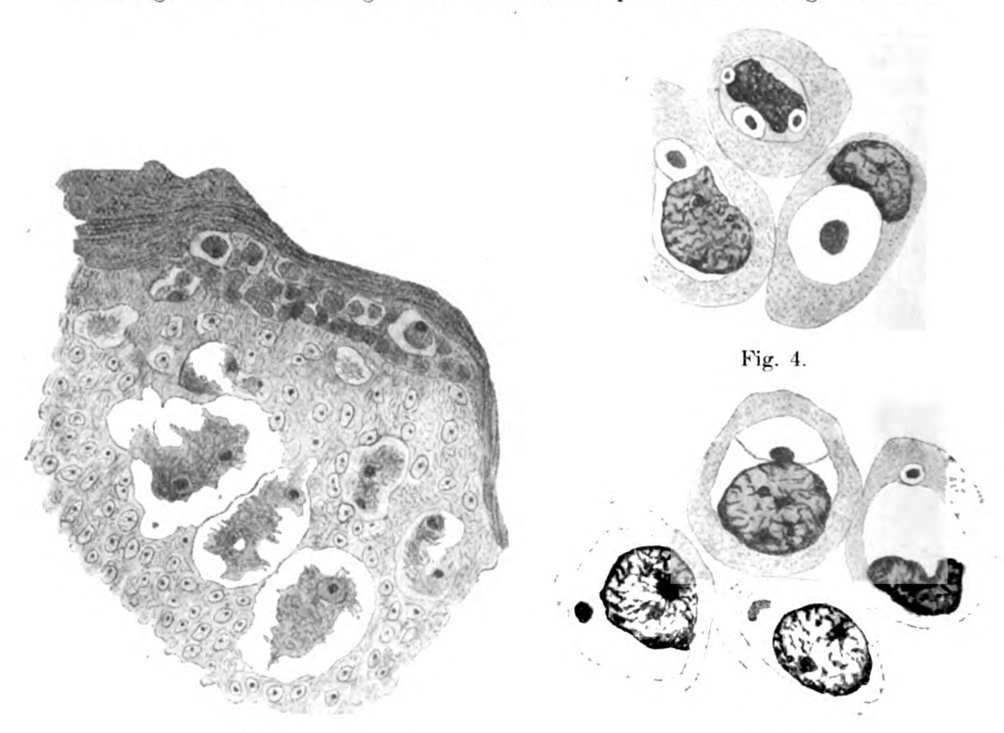


Fig. 4.

Fig. 3. Fig. 5.

Fig. 3. Randpartie einer Vakzinepustel vom Kamm des Huhnes 28, erste Generation. Völliges Fehlen von Guarnierischen Körperchen. Unna-Färbung. (Zeiß-Komp.-Ok. 4, Apochr. Imm. 2 mm 1,30).

Fig. 4. Epithelzellen von Cornea des Kaninchens 3, nach Impfung mit Pustelinhalt vom Huhn 15 (4. Generation). Typische Guarnierische Körperchen. Kombiniertes Bild. Unna-Färbung. (Zeiß-Komp.-Ok. 8, Apochr. Imm. 2 mm 1,30).

Fig. 5. Epithelzellen von Haut am Rücken des Kaninchens 4, nach Impfung mit Glyzerin-Vakzinelymphe. Guarnierisches Körperchen. Kombiniertes Bild. Unna-Färbung. (Zeiß-Komp.-Ok. 8, Apochr. Imm. 2 mm 1,30).

reiche, typische Guarnierische Körperchen (vgl. Fig. 4). Wir machten uns noch den Einwand, die Guarnierischen Körperchen, die ja meist in der Cornea studiert werden, seien vielleicht in den Affektionen der äußeren Haut schwerer erkennbar und uns daher ent-

gangen. Die mikroskopische Untersuchung der vakzinierten Rückenhaut eines Kaninchens zeigte aber auch hier die Guarnierischen Körperchen in voller Deutlichkeit (Fig. 5); wenn sie also in der Haut des Kammes beim Huhn nicht zu finden waren, bleibt nur der Schluß, daß Vakzine am Kamm des Huhnes nicht zur Bildung von Guarnierischen Körperchen führt.

Für diejenigen, die die Guarnierischen Körperchen für einen Organismus, für ein Entwicklungsstadium des Vakzineerregers halten, würde das also bedeuten, daß der Vakzineerreger sich durch mehrere Generationen fortführen läßt, ohne ein bestimmtes Entwicklungsstadium zu durchlaufen, das unter anderen Bedingungen regelmäßig gefunden wird. Etwas derartiges wäre gewiß möglich, aber doch immerhin auffällig. Einfacher liegen die Verhältnisse für diejenigen, die sich der Anschauung v. Prowazeks anschließen, der die Hauptmasse der Guarnierischen Körperchen für einen von der Wirtszelle gebildeten Mantel ansieht, der den Parasiten umgibt, oder wie Loewenthal seinerzeit die Zelleinschlüsse allgemein auffaßte, als spezifische Antwort spezifischer Zellen auf einen spezifischen Reiz. Bei dieser Anschauung bietet es dem Verständnis keine Schwierigkeit, daß nicht jede befallene Zellart mit der Bildung von Einschlüssen antwortet. Wenn also auch unser Befund, daß die Vakzineinfektion beim Huhn ohne Bildung von Guarnierischen Körperchen verläuft, keine Entscheidung über die Natur dieser Körperchen bringen kann, so spricht er doch am ungezwungensten zugunsten der Auffassung, daß die Guarnierischen Körperchen als Ganzes nicht Entwicklungsstadien des Vakzineerregers sind, sondern zwecks Einkapselung des Erregers von der Wirtszelle gebildet werden.

B. Uebertragung von Taubenpocken auf Kaninchen.

(Loewenthal u. Kadowaki.)

Wir haben nun auch den Gegenversuch gemacht, um festzustellen, ob mit Geflügelpocken beim Säugetier vakzineähnliche Veränderungen hervorzubringen sind. Derartige Versuche sind, wie in der Einleitung erwähnt, bereits ausgeführt worden. Aber van Heelsbergen macht über den mikroskopischen Befund bei den mit Geflügelpocken geimpften Säugetieren keine Angaben. Levaditi und Nicolau bezeichnen die durch Geflügelpockenvirus an der Haut des Kaninchens hervorgerufenen Veränderungen mikroskopisch als denen nach Vakzination entsprechend; über Anwesenheit oder Fehlen von Guarnierischen Körperchen oder anderen Einschlüssen äußern sie sich jedoch nicht, und in den Abbildungen sind keine Zelleinschlüsse gezeichnet; das beweist freilich nichts, da diese Autoren auch in ihren bei hinreichender Vergrößerung gezeichneten Figuren von Vakzineaffektionen keine G.-K. wiedergeben. Nur Toyoda gibt an, in der mit Geflügelpocken geimpften Cornea von Kaninchen und Meerschweinchen „wenige, aber sichere G. K.“ gefunden zu haben; es besteht aber eine Unklarheit darin, daß Toyoda auch die Geflügelpocken-Körperchen beim Huhn als „typische G. K.“ bezeichnet. Weitere Untersuchungen erschienen also nicht überflüssig.

Als Geflügelpockenvirus wurde ein Stamm von Taubenpocken benutzt, den wir dem freundlichen Entgegenkommen des Herrn Dr. van Heelsbergen in Utrecht verdanken. Das Virus erzeugte auf der Haut von Tauben Epithelveränderungen, die makro- und mikro-

skopisch die bekannten Charakteristika der Taubenpocken zeigten. Wir betonen, daß wir Taubenpocken benutzt haben, während die Geflügelpocken der anderen Autoren entweder von vornherein Hühnerpocken (van Heelsbergen) oder zum mindesten auf Hühnern fortgezüchtet waren. Wir konnten nicht voraussetzen, dadurch im Nachteil zu sein, da nach bisheriger Anschauung sämtliche Geflügelpocken durch dasselbe Virus erzeugt werden und Taubenpocken sogar für virulenter gelten, als die der Hühner.

Wir haben zur Impfung der Kaninchen ausschließlich in NaCl-Lösung fein verriebene Pocken von Tauben benutzt, weil es uns zunächst darauf ankam, die Wirkung des unveränderten Virus kennen zu lernen; Untersuchungen über die Anpassung des Virus an Kaninchen durch fortgesetzte Passagen sind noch im Gang, und über sie wird später Kondo gesondert berichten.

9 Kaninchen wurde das von frischen, gut entwickelten Pocken von Tauben stammende Material in die enthaarte und skarifizierte Rückenhaut eingerieben, 2 weiteren Kaninchen ebenso in die Haut des Ohres. Es trat zunächst geringe Rötung und Anschwellung der Impfstellen ein, die sich etwa vom 3. bis 5. Tage ab mit kleinen, unscheinbaren, schuppenartigen Krusten bedeckten, die einige Tage bestehen blieben. Papel- oder gar Pustelbildung wurde nie beobachtet, das ganze Bild machte nicht den Eindruck einer spezifischen Affektion, sondern erinnerte durchaus an die Reizerscheinungen nach unvorsichtiger Enthaarung. Von einer mikroskopischen Untersuchung der Impfstellen an der Haut wurde daher abgesehen. Spätere Erfahrungen im hiesigen institut haben gezeigt, daß es sich trotz der geringen Erscheinungen um eine spezifische Reaktion handelt.

Für die histologische Untersuchung wählten wir die Corneae von Kaninchen. Da ja Vakzinevirus selbst in geringen Mengen hier ganz charakteristische Erscheinungen hervorruft, nahmen wir an, daß wir eine vakzineähnliche Wirkung des Taubenpockenvirus am besten an der Kaninchencornea würden feststellen können. Im ganzen wurde 14 Kaninchen Pockenmaterial von Tauben, das mit möglichst wenig NaCl-Lösung fein verrieben war, in die kokainisierten, gitterförmig geritzten Corneae eingerieben. Die am lebenden Tier wahrzunehmende Reaktion war außerordentlich gering und mit den Erscheinungen nach Vakzinierung der Cornea nicht im entferntesten vergleichbar. Zu einer schwachen, eiterigen Sekretion kam es nur ein einziges Mal, 2 weitere Tiere hatten wenige Tage vermehrten Tränenfluß. Die Cornea selbst war die ersten Tage nach der Impfung leicht getrübt, das eine und andere Mal entwickelte sich auch ein kleines, flaches Ulcus, das schnell heilte und nie so stark wurde, daß es etwa zu perikornealer Injektion geführt hätte. Schwächer als auf Vakzine reagiert ja das Kaninchen auf Variola; aber nicht einmal die Epithelverdickung, die man nach Variolaimpfung an der Kaninchencornea zu sehen pflegt (Paulscher Versuch), war nach der Impfung mit Taubenpocken zu erkennen.

Die Kaninchen wurden verschieden lange Zeit, zwischen 60 Std. und 14 Tagen nach der Impfung getötet und die Corneae nach Fixierung in Zenkerscher Lösung oder Sublimatalkohol und Paraffineinbettung senkrecht zur Oberfläche geschnitten; Färbung mit Hämatoxylin-Eosin und nach Unna-Paul. Nach der Fixierung waren dem Paulschen Versuch entsprechende Veränderungen makroskopisch nicht erkennbar.

—

Ueber die mikroskopischen Befunde können wir uns kurz fassen. An den jüngeren Corneae war Ausfüllung der Verletzungsstellen durch Epithelzellen zu finden, an älteren auch etwas unregelmäßige Lagerung, Epithelverluste und Ansammlung von Rundzellen und in selteneren Fällen Vaskularisation der Substantia propria. Epithelverdickung jedoch war nirgends zu sehen, ebensowenig irgendwelche Zelleinschlüsse, die an Guarnierische oder Geflügelpocken-Körperchen erinnert hätten.

Auch dieser Teil der Untersuchungen spricht also für die seit Spinola und Bollinger geltende Anschauung und vermag die Annahme eines näheren Zusammenhanges zwischen Vakzine und Geflügelpocken (Taubenpocken) nicht zu stützen.

C. Immunologische Untersuchungen.
(Loewenthal u. Kondo.)

Als einfachste immunologische Untersuchung erscheint die Prüfung, ob Tiere nach Ueberstehen der einen Infektion auch gegen die andere geschützt sind. Solche Untersuchungen sind schon mehrfach ausgeführt worden, sie haben aber unklare und widersprechende Ergebnisse geliefert. Auch wir haben unser Tiermaterial, soweit es dafür geeignet war, nach dieser Richtung hin ausgenutzt, das Hauptgewicht jedoch auf serologische Prüfung gelegt, und zwar durch die für Vakzine am meisten verwendete Methode, den viruliziden Versuch.

Daß die Vakzineinfektion zur Bildung von viruliziden Stoffen führt, ist lange bekannt, daß die Neigung zur Bildung solcher Stoffe bei einzelnen Tierarten (Kaninchen, Mensch) verschieden stark ist, scheint aus den Untersuchungen von Sato, Fujii u. a. hervorzugehen, Geflügel aber ist, soweit uns bekannt, daraufhin noch nicht untersucht worden. Die ältere Angabe von Manteufel, daß nach dem Ueberstehen von Geflügelpocken im Serum der betreffenden Vögel virulizide Antikörper gegen Geflügelpocken nicht nachweisbar sind, gestattete daher noch keinen Schluß auf die biologische Verschiedenheit der beiden Vira, denn es konnte sich auch um eine verschiedene Reaktionsfähigkeit von Kaninchen und Geflügel handeln. Wir gingen also bei den Versuchen darauf aus, Vakzine und Geflügelpocken auf Tiere zu verimpfen, die für beide Vira empfänglich sind, und deren Sera dann auf virulizide Antikörper gegen beide Vira zu untersuchen. Da die Uebertragbarkeit der Geflügelpocken auf das Säugetier noch nicht eindeutig entschieden ist und speziell die Uebertragung auf das Kaninchen zum mindesten nicht regelmäßig gelingt, anderseits das Huhn für Vakzine empfänglich ist, und zwar besser als die Taube, war das Huhn das gegebene Versuchstier; doch wurden auch Tauben und Kaninchen mit herangezogen.

Der virulizide Versuch mit Vakzine wurde in der hier üblichen, wiederholt beschriebenen Weise ausgeführt: Mischung der 1:50 verdünnten Glyzerinlymphe mit gleichen Teilen der zu untersuchenden Serumverdünnung, Aufenthalt 2 Std. bei 37°, Verimpfung des Gemisches auf die skarifizierte Kaninchenkornea. Der Nachweis viruliziden Antikörper gegen Taubenpocke wurde in folgender Weise versucht: 0,5 g Taubenpockenmaterial wurde im Mörser mit 10 ccm Glyzerinwasser gründlich verrieben, zur Entfernung gröberer Partikel kurz zentrifugiert und nur die überstehende Flüssigkeit zum Versuch benutzt, indem ebenfalls gleiche Mengen des zu prüfenden Serum zu-

gesetzt und die Gemische 2 Std. bei 37^0 gehalten und dann auf die skarifizierten Augenlider (und gleichzeitig auf die gerupfte Brusthaut) von Tauben verimpft wurden. Als Kontrollen dienten Gemische der Vira mit NaCl-Lösung.

In einem Vorversuch wurde festgestellt, daß das Serum von 4 normalen Hühnern in der Verdünnung 1:10 und unverdünnt bei dieser Versuchsanordnung weder gegen Vakzine noch gegen Taubenpocke virulizid wirkte; die durch die Virus-Serumgemische erzeugten Reaktionen waren genau so stark, wie die Kontrollen.

2 Hühner, Nr. 1 und 2, wurden mit unverdünnter Glyzerinlymphe auf Kamm und Kehllappen mit Erfolg kräftig geimpft, nach 12 Tagen war Heilung eingetreten. 3 Wochen nach der Impfung wurde den Tieren Blut aus der Flügelvene entnommen; das Serum zeigte selbst unverdünnt keine virulizide Wirkung, weder gegen Vakzine noch gegen Taubenpocke. In entsprechender Weise wurden 2 Hühner, Nr. 1a und 2a, auf Kamm und Kehllappen kräftig mit Taubenpocken geimpft, die Affektionen heilten nach 15 Tagen. Das Serum dieser Tiere, 22 Tage nach der Impfung entnommen, erwies sich im viruliziden Versuch ebenfalls völlig wirkungslos gegen beide Vira.

Da unser Stamm von Taubenpocken bei der Taube sehr viel stärkere Erscheinungen hervorruft, als beim Huhn, wurde noch ein Versuch an der Taube ausgeführt. Eine Taube wurde an den 4 Augenlidern und an der Brusthaut mit Taubenpocken geimpft, die Heilung der ausgedehnten Epithelerkrankung nahm 3 Wochen in Anspruch. Trotz dieser intensiven Reaktion enthielt das 44 Tage nach der Impfung entnommene Serum keine viruliziden Antikörper gegen eines der Vira.

Es wurde also bestätigt, daß das einmalige Ueberstehen von Taubenpocken bei Huhn und Taube keine mit der angewendeten Methode nachweisbaren viruliziden Antikörper erzeugt. Aber auch das einmalige Ueberstehen von Vakzine verläuft beim Huhn, im Gegensatz zum Kaninchen, ohne Bildung solcher Antikörper, das Huhn ist in dieser Richtung weniger reaktionsfähig, als das Kaninchen. Beim Fehlen aller viruliziden Stoffe geben diese Versuche somit keinen Aufschluß darüber, ob die untersuchten Vira verschieden sind oder nicht.

Wir suchten nun durch wiederholte Impfung die Antikörperbildung zu erzwingen. 2 Hühner, Nr. 3 und 4, wurden auf Kamm und Kehllappen kräftig mit Vakzine (Glyzerinlymphe) geimpft; positiver Impferfolg. Wiederholung auf Kamm und Kehllappen nach 2 Wochen, ohne Erfolg (Kontrollimpfung auf normalem Huhn positiv). Nach weiteren 10 Tagen subkutane Injektion von 0,5 ccm Glyzerinlymphe, 3 Wochen danach Blutentnahme und virulizider Versuch. Durch diese intensive Vorbehandlung gelang es nun tatsächlich, virulizide Antikörper zu erzeugen. Das Serum beider Hühner tötete, unverdünnt, das Vakzinevirus völlig ab, die Verimpfung der Serumvakzinemischung auf die Kaninchenkornea verlief reaktionslos. Immerhin war der Antikörpergehalt nicht groß, denn die 10fach verdünnten Sera blieben im viruliziden Versuch wirkungslos. Die Sera, unverdünnt und 1:10, wurden nun auch mit Taubenpockenvirus versetzt und auf Tauben verimpft, ein Unterschied gegen die Kontrolle war jedoch nicht zu erkennen.

Gleichzeitig mit diesen Hühnern waren noch 2 weitere, Nr. 5 und 6, in der gleichen Weise vorbehandelt worden, die Sera wurden

aber erst 32 Tage nach Schluß der Vorbehandlung entnommen. Der Befund von Serum 6 stimmte mit dem eben geschilderten (Nr. 3 und 4) völlig überein; das Serum von Huhn 5 zeigte nur schwache Virulizidie, indem es auch unverdünnt die Vakzinewirkung nicht völlig unterdrückte, sondern nur verzögerte. Gegen Taubenpocken waren beide Sera unwirksam. Bei Hühnern also, die mit Vakzine wiederholt vorbehandelt sind, werden virulizide Antikörper gebildet, sie richten sich aber nur gegen Vakzine, nicht gegen das Virus der Taubenpocken.

Ein entsprechender Versuch wurde mit Taubenpocken angestellt. 2 Hühner, Nr. 3a und 4a, wurden auf Kamm und Kehllappen mit Taubenpocken geimpft; kräftige Reaktion. Wiederholung der Impfung auf Kamm und Kehllappen nach 14 Tagen negativ (Impfung an normalem Kontrolltier positiv). Nach weiteren 10 Tagen subkutane Injektion von 0,5 ccm einer dichten Verreibung (1:5) von Taubenpockenmaterial in Kochsalzlösung, 21 Tage später Blutentnahme und virulizider Versuch. Trotz dieser kräftigen Vorbehandlung waren keinerlei virulizide Stoffe nachweisbar, weder gegen Taubenpocken noch gegen Vakzine.

Wir haben die Versuche noch etwas weiter ausgestaltet, ausgehend von der Angabe von Levaditi und Nicolau, daß auch bei einem Vakzine-immunen Huhn Vakzine haftet, wenn sie gleichzeitig mit Geflügelpocke verimpft wird. Wenn auch diese Autoren den Vorgang rein zellulär deuten, so zeigt doch der Versuch jedenfalls, daß irgendwelche Wechselbeziehungen zwischen diesen beiden Immunitäten bestehen können. Wir dachten also daran, daß bei einem gegen Taubenpocken immunen Huhn durch Vakzinierung vielleicht auch viruIizide Antikörper gegen Taubenpocke hervorgerufen werden könnten. Die eben erwähnten Hühner Nr. 3a und 4a wurden also mit Vakzine kutan geimpft (positiver Impferfolg) und erhielten nach weiteren 9 Tagen noch 0,5 ccm Glyzerinlymphe und 0,5 ccm einer dichten Verreibung von Taubenpocken subkutan. Blutentnahme 9 Tage nach dieser Einspritzung. Die Sera beider Hühner machten im viruliziden Versuch unverdünnt Vakzine unwirksam und noch 10fach verdünnt verzögerten sie die Vakzineentwicklung auf der Kaninchencornea. Gegen Taubenpocke jedoch waren auch in den unverdünnten Sera keine viruliziden Stoffe nachweisbar. Also selbst beim Huhn, das gegen Taubenpocken immunisiert ist, vermag die gleichzeitige Impfung mit Vakzine und Taubenpocken die Bildung von viruliziden Antikörpern nur gegen Vakzine anzuregen, nicht auch gegen Taubenpocke.

Da die Antikörperbildung gegen Vakzine beim Huhn sich als so schwach erwies, wollten wir trotz der gefundenen Differenzen aus diesen Versuchen noch keine bindenden Schlüsse ziehen, sondern haben noch Immunisierungsversuche am Kaninchen angeschlossen. 3 Kaninchen (Nr. 1—3) wurden auf einem größeren Bezirk der enthaarten Rückenhaut kutan mit Vakzine (Glyzerinlymphe) geimpft, mit gewohntem positiven Erfolg, und erhielten 10 Tage später je 0,5 ccm unverdünnter Glyzerinlymphe subkutan. Eines der Tiere starb marantisch. Ebenso wurden 3 Kaninchen (Nr. 1a—3a) auf der enthaarten und skarifizierten Rückenhaut mit Taubenpocke geimpft, es trat leichte Rötung und Schorfbildung ein, die von Reizerscheinungen durch das Depilatorium nicht sicher zu unterscheiden war; 10 Tage später erhielten die Tiere je 0,5 ccm einer dichten Verreibung von Taubenpocke in NaCl-

Lösung (1:5) subkutan. Auch von diesen Tieren starb nach der subkutanen Injektion eines unter fortschreitender Abmagerung, so daß von jeder Gruppe 2 Tiere übrig blieben. 10 Tage nach der subkutanen Injektion wurde den Tieren Blut entnommen und das Serum im viruliziden Versuch geprüft. Das Serum der mit Vakzine vorbehandelten Kaninchen Nr. 1 und 2 war recht deutlich antivirulent; in der Verdünnung 1:5 machte es die Vakzine unwirksam, in der Verdünnung 1:20 verzögerte es noch das Auftreten der spezifischen Veränderungen auf der geimpften Kaninchenkornea. Aber auch diese stärker viruliziden Sera erwiesen sich selbst unverdünnt als völlig unwirksam gegen Taubenpocke. Die Sera der mit Taubenpocke vorbehandelten Kaninchen Nr. 1a und 2a enthielten überhaupt keine nachweisbaren Antikörper; sie waren in der Verdünnung 1:20 und 1:5 (nur diese wurden geprüft) unwirksam gegen Vakzine[1]) und selbst unverdünnt unwirksam gegen Taubenpocke.

Die Versuche haben also eine weitgehende immunbiologische Verschiedenheit unserer Vira, der Berner Vakzine und des von uns benutzten Taubenpockenstammes ergeben. Die Vakzine als Antigen gibt zur Bildung von viruliziden Stoffen Anlaß, stark beim Kaninchen, schwach beim Huhn; die Viruliziđie richtet sich nur gegen das Virus der Vakzine, nicht gegen das der Taubenpocken. Nach der Vorbehandlung mit Taubenpocken jedoch lassen sich im Serum von Taube, Huhn und Kaninchen keine viruliziden Stoffe nachweisen, weder gegen Taubenpocken noch gegen Vakzine.

Diese Verschiedenheit wird auch durch die Ergebnisse der Nachimpfungen bestätigt. Daß das Ueberstehen von Vakzine sowohl wie von Geflügelpocken Immunität gegen die betreffende Infektion hinterläßt, ist bekannt und konnte auch in unseren Versuchen wieder festgestellt werden. Huhn Nr. 3 und 4 erwiesen sich, wie schon erwähnt, 2 Wochen nach kutaner Vakzinierung am Kamm und Kehllappen gegen eine erneute Kutanimpfung an denselben Stellen mit Vakzine unempfänglich, ebenso die mit Taubenpocken einmal geimpften Hühner Nr. 3a und 4a gegen Taubenpocken.

Die Immunität ist streng spezifisch, Huhn Nr. 1 und 2 waren am 5. 5. an Kamm und Kehllappen kutan mit Vakzine geimpft worden; sie wurden am 1. 6. an denselben Stellen mit Taubenpocken nachgeimpft. Huhn Nr. 3 und 4 waren vom 5.—29. 5. mit Vakzine 2mal kutan an Kamm und Kehllappen und 1mal subkutan geimpft worden und wurden am 26. 6. an Kamm und Kehllappen mit Taubenpocken infiziert. Die Nachimpfungen mit Taubenpocken hatten bei allen 4 Hühnern ebenso starken Erfolg, wie bei normalen Kontrollhühnern. Ganz entsprechend fiel der Gegenversuch aus; Huhn 1a und 2a wurden am 11. 5. an Kamm und Kehllappen mit Taubenpocken, am 9. 6. mit Vakzine geimpft. Ferner hatten Huhn Nr. 3a und 4a vom 5.—29. 5. zwei kutane Impfungen an Kamm und Kehllappen und eine subkutane Impfung mit Taubenpocken erhalten und wurden am 26. 6. an Kamm und Kehllappen kutan mit Vakzine geimpft; auch diese 4 Hühner zeigten dieselben Erscheinungen, wie gleichzeitig geimpfte normale Kontrollhühner. Eine wechselseitige Immunität war also selbst an den ursprüng-

1) Die Reaktion der mit Vakzine-Serumgemisch geimpften Corneae war sogar deutlich stärker, als die der Kontrollimpfungen; in dem Kaninchenserum war Virus der Taubenpocken nachweisbar; worüber später berichtet werden soll.

lichen Impfstellen auch nicht einmal andeutungsweise zu erkennen. Diese Befunde stehen in schroffem Widerspruch zu den Angaben von van Heelsbergen und von Toyoda, stimmen aber gut zu denen von Levaditi und Nicolau.

Das Gesamtergebnis all dieser Untersuchungen ist vollkommen klar und eindeutig, daß es sich nämlich bei den von uns geprüften Stämmen von Taubenpocke und Vakzine um 2 verschiedene Vira handelt. Anderseits zeigen die Befunde von van Heelsbergen und von Toyoda fast ebenso klar und eindeutig eine außerordentlich nahe Zusammengehörigkeit, wenn nicht Uebereinstimmung des Erregers der Geflügel- und Säugetierpocken in klinischer wie in immunologischer Beziehung, und es liegt kein Anhaltspunkt vor, diese Befunde anzuzweifeln. Es besteht also ein anscheinend unüberbrückbarer Gegensatz, der nur darin seine Erklärung finden kann, daß die einzelnen Autoren mit verschiedenen Stämmen von Geflügelpocken gearbeitet haben.

Man müßte dann annehmen, daß die Geflügelpocken ätiologisch keine einheitliche Krankheit sind; und hier könnte man sich wiederum vorstellen, daß entweder mit dem Namen Pocken verschiedene Affektionen des Geflügels belegt werden, oder daß bei Huhn und Taube verschiedene Erkrankungen vorkommen oder auch, und das ist wohl die nächstliegende Deutung, daß das Pockenvirus aller Tierarten gemeinsamen Ursprungs ist, die Anpassung des Pockenvirus an den Organismus des Geflügels sich aber nur langsam vollzieht. Es wäre dann also möglich, daß man unter Umständen einem Virus begegnet, das noch nicht genügend spezifisch gefestigt und daher reversibel ist, d. h. sich verhältnismäßig leicht wieder zur Vakzine zurückführen läßt. Erst wenn durch langdauernde Fortzüchtung im Geflügelkörper das Virus sich dieser Tierart endgültig angepaßt hat, würde sich, bei dieser Betrachtungsweise, die Umzüchtung nicht mehr herbeiführen lassen. Es muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben, um in dieser Richtung eine Klärung herbeizuführen.

Auch der von uns benutzte Stamm von Taubenpocken läßt sich, wie in der letzten Zeit von uns ausgeführte Versuche gezeigt haben, an das Kaninchen anpassen. Die Prüfung, ob und inwieweit das Virus bei längerer Kaninchenpassage sich in seinen Eigenschaften dem Vakzinevirus nähert, ist noch nicht zum Abschluß gelangt; die Ergebnisse sollen später mitgeteilt werden. Aber selbst wenn es gelingen sollte, unseren Stamm von Taubenpocken in typische Vakzine bzw. Lapine umzuwandeln, bleibt doch die Tatsache bestehen, daß die Vira der vom Rind gewonnenen Vakzine und unserer Taubenpocke in ihrem ursprünglichen Zustand (d. h. zur Zeit der Entnahme von Rind bzw. Taube) in bezug auf die Art der durch sie hervorgerufenen Affektionen und auf ihr immunologisches Verhalten so weitgehend voneinander abweichen, wie wir es sonst nur bei artverschiedenen Krankheitserregern kennen.

Zusammenfassung.

1. Die Uebertragbarkeit der Vakzine auf Geflügel wird bestätigt. Vakzine geht am besten auf dem Kamm des Huhnes an; Impfung auf Cornea von Huhn und Taube erzeugt keine

makroskopisch erkennbaren Veränderungen. — 2. Bei Fortzüchtung der Vakzine von Huhn zu Huhn tritt in 5 Generationen keine Anpassung an den Organismus des Huhnes ein, sondern der Impferfolg wird im Gegenteil immer geringer. — 3. Die Vakzineeffloreszenzen nähern sich durch Hühnerpassage auch in ihrem histologischen Charakter nicht der Geflügelpocke. Insbesondere fehlen die charakteristischen Zelleinschlüsse. — 4. Die Vakzine beim Huhn verläuft ohne Bildung von Guarnierischen Körperchen. — 5. Die durch das Huhn mehrfach passierte Vakzine ist leicht auf das Säugetier (Kaninchen) zurück zu übertragen und erzeugt hier die für Vakzine charakteristischen Veränderungen (Epithelwucherung, Guarnierische Körperchen). — 6. Originäre Taubenpocke erzeugt auf der Kaninchencornea keine Guarnierischen Körperchen. — 7. Auch beim Huhn lassen sich viruliziden Antikörper gegen Vakzine erzeugen, aber viel schwerer und in geringerer Menge als beim Kaninchen. — 8. Die durch Vakzine erzeugten viruliziden Antikörper im Serum von Huhn und Kaninchen richten sich nur gegen Vakzine; sie sind unwirksam gegen das Virus der Taubenpocken. — 9. Durch Vorbehandlung mit Taubenpocken gelang es bei Taube, Huhn und Kaninchen nicht, virulizide Antikörper hervorzurufen, weder gegen Vakzine noch gegen Taubenpocken. — 10. Hühner sind nach dem Ueberstehen von Vakzine gegen Vakzine, nach dem Ueberstehen von Taubenpocken gegen Taubenpocken geschützt; eine wechselseitige Immunität aber läßt sich nicht nachweisen. — 11. Nach diesen Befunden sind die untersuchten Erreger der Vakzine und der Taubenpocken als weitgehend verschieden anzusehen. — 12. Diese Feststellungen gelten nur für den von uns benutzten Stamm von Taubenpocken. Nach den Befunden anderer Autoren stehen sich die Erreger von Vakzine und Geflügelpocken außerordentlich nahe und lassen sich ineinander überführen. Vielleicht sind also die Geflügelpocken keine ätiologisch einheitliche Krankheit.

Literatur.

v. Betegh, zit. nach Hutyra u. Marek. — Bollinger, Virch. Arch. Bd. 58. 1873. — Fujii, Ztschr. f. Imm.-Forschg. Bd. 33. 1922. — Gins, Ztschr. f. Hyg. Bd. 89. 1919. — van Heelsbergen, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 84. 1920. Bd. 89. 1922. — Hutyra u. Marek, Spez. Pathol. u. Therap. d. Haustiere. 6. Aufl. Bd. 1. Jena 1922. — Keysselitz, Arch. f. Protistenkund. Bd. 11. 1908. — Levaditi u. Nicolau, Ann. Pasteur. T. 37. 1923. — Loewenthal, Dtsch. med. Woch. 1906. — Ders., Ztschr. f. Krebsforschung. Bd. 3. 1907. — Manteufel, Arb. a. d. Kaiserl. Ges.-Amt. Bd. 33. 1910. — v. Prowazek, Handb. d. pathog. Protozoen. Bd. 1. S. 132. Leipzig 1912. — Reischauer, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 40. 1906. — Sato, Ztschr. f. Imm.-Forsch. Bd. 32. 1921. — Sanfelice, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 70. 1913. — Spinola, Handb. d. spez. Path. u. Therap. f. Tierärzte. 1858. — Toyoda, Ztschr. f. Hyg. Bd. 102. 1924.

Nachdruck verboten.

Die Ansteckungsfähigkeit des Blutes bei Lyssa humana[1]).

[Aus dem Odessaer Staatsbakteriologischen Institut und aus dem Poltawaer Pasteurinstitut.]

Von Dr. **Otto Herrmann**,

Chef des Pasteurinstituts in Poltawa.

Schon Bujwid, Marie, Galli-Valerio und Konradi haben gefunden, daß das Blut tollwütiger Tiere virulent ist. Es hat jedoch meines Wissens bis jetzt noch niemand im Blute der an Lyssa erkrankten Menschen das Wutvirus nachgewiesen.

Ich erhielt ein positives Resultat, und zwar erst nach 8 Monaten, nach Infektion eines Kaninchens sub duram mit dem Blutserum aus dem Herzen einer an Tollwut gestorbenen Frau.

Patientin E. Ch., 40 Jahre alt, erkrankte an Hydrophobia 1 Monat nach dem Bisse in die Hand von einem Hunde und starb 4 Tage darauf (1. 12. 1922).

Im Ammonshorn fand ich Negrische Körperchen.

Am 3. 12. 1922 wurde mit der Emulsion des Ammonshorns subdural das Kaninchen Nr. 2 infiziert, das am 2. 2. 1923 erkrankte und unter typischen Erscheinungen der Wut am 4. 2., also 63 Tage nach der Infektion, zugrunde ging.

Am 6. 2. wurde mit dem Gehirn dieses Tieres das Kaninchen Nr. 12 subdural infiziert. Es erkrankte am 3. 3. und starb an Wut am 5. 3., also nach 27 Tagen.

Mit der Emulsion der Gland. submaxillaris wurden am 3. 12. 1922 subdural und intramuskulär 2 Kaninchen, Nr. 4 und Nr. 5, inokuliert.

Infiziert				Wann erkrankt	Stad. morbi	Gestorben am	Nach wieviel Tagen gest.	Todes-ursache
wer	womit	wie	wann					
Kaninch. 2	Gehirn der Frau E Ch.	s. dur.	3. 12. 22	2. 2.	2	4. 2.	63	Wut
„ 12	Gehirn des Kan. 2	„	6. 2 23	3. 3.	2	5. 3.	27	„
„ 4	Gl. subm. der E. Ch.	„	3. 12. 22		—	5. 12.	2	Sepsis
„ 5	dgl.	i. musc.	3. 12. 22	9. 3.	8	18. 3.	105	Wut
„ 3	Blutserum der E. Ch.	s. dur.	3. 12. 22	29. 6.	37	5. 8.	245	„
Meerschw. 60	„ des Kan. 3	i. ces.	1. 8. 23	8. 8.	1$^1/_2$	9. 8.	9	„
„ 74	Geh. des Meerschw. 60	„	9. 8. 23	2. 9.	1	3. 9.	25	„
„ 75	dgl.	„	9. 8. 23	15. 8.	2	17. 8.	8	„
„ 67	Blut des Kaninch. 3	s. cut.	2. 8. 23	17. 8.	7	24. 8.	22	„
Kaninch. 68	Geh. des „ 3	s. dur.	5. 8. 23	15. 8.	2	17. 8.	12	„
„ 69	dgl.	„	5. 8. 23	—	—	8. 8.	3	Sepsis
Meerschw. 72	„	i. cer.	5. 8. 23	14. 8.	2	16. 8.	11	Wut
„ •73	„	s. cut.	5. 8. 23	6. 9.	30	Genaß am 9. 10. Starb plötzlich am 18. 5. 24	287	Unbek.
Kaninch. 6	Blutserum der E. Ch.	i. musc.	3. 12. 22	12. 2.	2	Genaß am 21. 12. Wieder inf. V. f. 17. 2.	12	Wut

1) Nach einem Vortrage während der „IV. Allukrainischen Tagung der Bakteriologen, Epidemiologen und Sanitätsärzte“ vom 17. bis 20. April 1924 in Charkow.

Das subdural infizierte starb am 5. 12. 1922, wie leicht vorauszusehen war, an Sepsis. Das intramuskulär infizierte erkrankte am 9. 3. 1923 und starb am 17. 3., also 105 Tage nach der Inokulation, unter Erscheinungen der Lähmungen.

Die Resultate dieser Impfungen und der folgenden Untersuchungen sind in der Tabelle schematisch angegeben. In allen Fällen wurde das Blut und das Gehirn auf Sterilität untersucht.

Wir sehen also, daß die Frau E. Ch. tatsächlich an Rabies gestorben ist. Wir sehen außerdem, daß das mit dem Gehirn subdural infizierte Kaninchen 2 nach 63 Tagen und das mit der Speicheldrüse intramuskulär inokulierte Kaninchen 5 erst 105 Tage nach der Infektion, also nach einer sehr langen Inkubationsdauer starben, man muß daher annehmen, daß das Wutvirus in diesem Falle sehr abgeschwächt war. A priori konnte man daher sagen, daß das Wutvirus, falls das Blut dieser Frau als infektionsfähig sich erweisen sollte, erst nach einer sehr langen Zeit beim Kaninchen die Krankheit zum Ausbruch bringen würde. Und in der Tat blieb das mit dem Blutserum der E. Ch. subdural infizierte Kaninchen 3 sehr lange Zeit wohl und munter. Es erkrankte erst am 29. 5. 1923, also 208 Tage nach der Infektion, und starb unter Lähmungen nach einer Krankheitsdauer von 37 Tagen. Etliche Male waren Besserungen und Verschlimmerungen bei stetem Torticollis zu verzeichnen. Das Gewicht fiel von 2650 auf 1570 g.

Am 1. 8., also 5 Tage vor dem Tode des Kaninchens 3, wurde demselben etwas Blut aus den Ohrvenen entnommen und mit dem Serum (0,1—0,2 ccm) intrazerebral das Meerschweinchen 60 infiziert. Dasselbe erkrankte am 8. 8. und ging unter paralytischen Erscheinungen am 9. 8. zugrunde.

Am 9. 8. wurde mit dem Gehirn des Meerschweinchens 60 die Meerschweinchen 75 und 74 intrazerebral infiziert. Das erstere erkrankte am 15. 8. und starb unter typischen Erscheinungen der Wut am 17. 8., also nach 8 Tagen nach der Inokulation. Das zweite erkrankte nach 24 Tagen und starb an Wut einen Tag darauf. Von 495 g fiel das Gewicht bis auf 260 g herunter.

Am 2. 8. infizierte ich das Meerschweinchen 67 subkutan mit dem hämolytischen Blute (ca. 0,4 mit 3,0 phys. Kochsalzlösung), welches dem Kaninchen 3 5 Tage vor dem Tode entnommen wurde. Es erkrankte am 17. 8. und ging unter paralytischen Erscheinungen am 24. 8., also 22 Tage nach der Inokulation zugrunde. Das Gewicht ist von 370 auf 210 g gefallen.

Am 5. 8. wurde mit dem Gehirn des Kaninchen 3 das Kaninchen 68 subdural infiziert. Es erkrankte am 15. 8. und ging an Tollwut am 17. 8., also nach 12 Tagen zugrunde.

Am 5. 8. wurde mit demselben Gehirn intrazerebral das Meerschweinchen 72 inokuliert. Es erkrankte am 14. 8. und starb an Tollwut am 16. 8., also nach 11 Tagen.

Am 5. 8. wurde mit demselben Gehirn subkutan das Meerschweinchen 73 infiziert. Am 6. 9. saß es unbeweglich; nach einem leichten Stoße fiel es und konnte sich nur mit großer Mühe wieder aufrichten. Das Gewicht ist von 460 auf 255 g gefallen. Allmählich wurde es wieder munterer, der Gang wurde sicherer und das Gewicht nahm immer mehr zu, sodaß am 6. 10. es wieder 470 g aufwies. Es war noch am 16. 5. 1924 ganz gesund (Gewicht 625 g), starb jedoch plötzlich am 18. 5. (in meiner Abwesenheit) aus unbekanntem Grunde.

Die Verimpfungen auf die Meerschweinchen 60, 75, 74, 67, 72 u. 73 und auf das Kaninchen 68 zeigen, daß das Kaninchen 3, welches mit dem Blutserum von der an Tollwut gestorbenen Frau E. Ch. subdural infiziert wurde, wirklich an Lyssa gestorben war, und zwar 245 Tage nach der Infektion und nach einer Krankheitsdauer von 37 Tagen.

Eine derartig lange Inkubations- und Krankheitsdauer zeichnet sich recht scharf ab von dem klassischen Bilde der experimentellen Tollwut, jedoch auch andere Untersucher haben solche Erscheinungen beschrieben. So hat Konradi bei Kaninchen eine Inkubationsdauer von 382, 529 und sogar 725 Tagen und eine Krankheitsdauer von 22, 24 und 40 Tagen beobachtet.

Noch eine bedeutend längere Krankheitsdauer, und zwar bis $1^1/_2$ Jahre, gibt v. Löte bei seinen Untersuchungen mit Vögeln an; auch der Verlauf der von ihm beobachteten Krankheit ähnelt etwas

meinem Falle, da Verschlimmerungen und Besserungen recht oft aufeinander folgten. Auch er hat große Gewichtsschwankungen bei 2 Hühnern und 1 Taube feststellen können.

Aus diesem allen kann man den Schluß ziehen, daß das abgeschwächte Wutvirus nicht nur öfters eine lange Inkubationsdauer, sondern auch ein bedeutendes Stadium morbi veranlassen kann, und daß hierbei Versuchstiere sogar zuweilen genesen können. In meinen Untersuchungen dauerte das Stadium morbi beim Meerschweinchen Nr. 67 7 Tage, beim Meerschweinchen Nr. 73 30 Tage, nach welchem es sich wieder erholte, beim Kaninchen Nr. 5 8 Tage und beim Kaninchen Nr. 3 sogar 37 Tage. Bei Konradi waren Kaninchen bis 40 Tage, bei v. Löte Vögel über ein Jahr krank und bei Remlinger sind beim Gebrauche eines abgeschwächten Virus viele Kaninchen gar nicht krank geworden, nur etliche erkrankten und zeigten Torticollis.

Andererseits wird das nach der Wutkrankheit gesund gewordene Tier wahrscheinlich einigermaßen immun. So wurde die Taube von v. Löte zum 2. Male nach $1^1/_2$ Jahren ohne Erfolg infiziert. Ich bekam bei meinen Versuchen ein etwas ähnliches Resultat:

Das Kaninchen Nr. 6 wurde am 3. 12. 22 mit 1 ccm Blutserum von der Frau E. Ch. intramuskulär inokuliert. Am 19.—20. 12. saß es zusammengekauert und nahm kein Futter zu sich. Jedoch schon am 21. 12. war es wieder munter und seitdem 7 Monate lang gesund. Am 17. 7. 23 wurde es mit fixem Virus unter die harte Hirnhaut infiziert. Nach 8 Tagen, als die üblichen Passagekaninchen vom 16. 8. und 18. 8. schon tot waren, war das Kaninchen 6 noch gesund, obwohl, wie ich schon früher in einer meiner Arbeiten beschrieben habe, die mit unserem fixen Virus subdural infizierten Kaninchen in der Regel schon am 3.—5. Tage erkranken und nach 6—7 Tagen sterben. Kaninchen 6 wurde erst nach 9 Tagen krank und ging an Wut 12 Tage nach der Infektion ein. Es scheint somit, daß das Kaninchen 6 teilweise immun geworden ist, jedoch nicht hinlänglich genug, um die subdurale Infektion mit fixem Virus zu überstehen.

Aus den Versuchen mit den Kaninchen 3 und 6 sehen wir, daß nicht nur bei experimentell mit Wutvirus infizierten, sondern auch bei unter natürlichen Umständen erkrankten Tieren, in unserem Falle beim Menschen, das Blut infektionsfähig ist. Es ist deshalb zu fordern, daß diejenigen, denen Blut tollwütiger Tiere auf die verletzte Haut oder Schleimhaut gelangt, sich der Wutschutzimpfung unterwerfen.

Ob das Blut tollwütiger Menschen immer ansteckend ist, würde man nur bei Massenversuchen ausfindig machen können, dabei müßte man aber stets im Auge behalten, daß die Versuchstiere hin und wieder sehr lange Zeit beobachtet werden müssen (1—2 Jahre). Außerdem müßte man, um sicher zu gehen, stets eine größere Anzahl Versuchstiere infizieren. Abba u. Bormans haben einmal 2 Kaninchen subdural geimpft mit dem Gehirn eines an Tollwut gestorbenen Menschen, ohne bei den Tieren Lyssa hervorzurufen. Schiemann hat in einem Falle viele Kaninchen und Meerschweinchen intramuskulär mit verschiedenen Materialien (Blut, Milz, Pankreas, Achseldrüse, Nebenniere, Knochenmark, Leber, N. brachialis, Gehirn und Rückenmark) von an Wut gestorbenen Menschen infiziert und nur mit dem Rückenmark sichere Wut bei einem der infizierten Kaninchen erzeugen können.

Schlußfolgerungen.

1) Das Blut kann nicht nur bei experimenteller Wut, sondern auch bei der natürlichen Erkrankung von Mensch und Tier infektionsfähig sein.

2) Es gelang in einem Falle, mit dem Blute einer an Wut erkrankten Frau subdural ein Kaninchen 3 und mit dem Blute dieses Kaninchens subdural und subkutan Meerschweinchen zu infizieren.

3) Die Virulenz des Blutes bei der Tollwut scheint zumeist sehr gering zu sein. Wahrscheinlich ist deshalb die Inkubations- und Krankheitsdauer nach Infektion mit derartigem Blute sehr groß. Die Erkrankung kann bei manchen Tieren in Genesung übergehen und in einzelnen Fällen bleibt sogar jede Erkrankung aus.

Literatur.

Abba et Bormans. (Ann. de l'Inst. Past. 1905. p. 49.) — Bujwid. (Centralbl. f. Bakt. Bd. 3. 1888. S. 798.) — Galli-Valerio, B. (Ibid. Bd. 40.) — Herrmann, O. (Prophylakt. Med. 1924. Nr. 5—6. S. 56. [russ.].) — Konradi, D. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 33. 1903; Bd. 38. S. 194; Bd. 47 u. Bd. 73.) — Löte, J. v. (Ibid. Abt. I. Orig. Bd. 35. 1904.) — Marie, A. Compt. rend. Soc. de Biol. 1905. Nr. 1.; 1909. p. 49.) — Remlinger, P. (Ann. de l'Inst. Past. 1923. p. 852.) — Schiemann, O. (Ztschr. f. Hyg. Bd. 72. 1912.)

Einige Betrachtungen über die Immunitätserscheinungen und deren Dauer bei der Echinokokkose.

[Aus dem Institut für Pathologische Anatomie des Ospedale Civile zu Venedig (Direktor: Prof. Dr. G. Cagnetto).]

Von Dr. **Bartolomeo Bisbini.**

Die Erkennung der Echinokokkuserkrankungen ist sehr oft so außerordentlich schwierig, daß die Heranziehung auf serologischer und biologischer Forschung beruhender technischer Hilfsmittel nicht nur nützlich, sondern geradezu notwendig geworden ist.

Die diesem Zwecke dienenden Laboratoriumsuntersuchungen sind in letzter Zeit bedeutend vermehrt worden; die wertvollsten sind: 1. Vermehrung der eosinophilen Zellen im strömenden Blut. — 2. Die Ablenkung des Komplements. — 3. Die Intradermoreaktion von Casoni. — 4. Die Meiostagminreaktion vor Ascoli. — 5. Die anaphylaktische Reaktion beim Tiere. — 6. Die Ophthalmo- und Cutireaktion.

Von diesen Untersuchungsmethoden sind die 3 ersten die am meisten gebrauchten. Viele haben mit Bestimmtheit herauszufinden versucht, welche von ihnen die sicherste sei. Die dabei erhaltenen Ergebnisse sind jedoch nicht übereinstimmend.

Auch nach Ansicht der neueren und letzten Forscher solll die Eosinophilie in jedem Falle, der Verdacht auf Echinokokkose aufkommen läßt, zu allererst festgestellt werden, denn ganz abgesehen davon, daß man dabei sehr oft positives Ergebnis hat, ist auch die Durchführung des Versuchs für jeden sehr leicht. Eine Zeitlang hat man fast an die Unfehlbarkeit der Methode geglaubt, und zwar so sehr, daß man geneigt war, die Gegenwart des Parasiten bei fehlender Eosinophilie auszuschließen. Nachdem man jedoch später festgestellt hatte, daß der Prozentsatz der eosinophilen Zellen ganz bedeutend schwanken kann (4—40 Proz.), konnte man sich auch der Einsicht nicht verschließen, daß die Eosinophilie einen viel weniger absoluten Wert hat, als man zu Anfang glaubte, und daß sie in vielen Fällen von Echinokokkose tatsächlich fehlen kann. Ohne Zweifel ist diese Verschiedenheit im hämatologischen Verhalten bei den verschiedenen vom Echinokokkus befallenen Individuen desto überraschender, als es uns — wenigstens bis heute — nicht gelungen ist, den wahren Grund zu begreifen. Ferner ist dann die geringe Bewertung der hämatologischen Eosinophilieprobe auch der, einer großen Bedeutung sicherlich nicht entbehrenden Tatsache zuzuschreiben, daß sowohl die Echinokokkose, wie auch ver-

schiedene andere Erkrankungszustände von Eosinophilie begleitet sein können, so z. B. gewisse Formen der Appendizitis, verschiedene parasitäre Krankheiten, mehrere Infektionen und etliche Blutkrankheiten auf hämomyelopoietischer Grundlage.

Die Intradermoreaktion Casonis ist, wo sie positiv ausfällt, sicherlich ein sehr wertvolles, direktes Untersuchungsverfahren; bei negativem Ausfall ist jedoch auch dieses Verfahren, wie jede andere biologische Probe, jeden praktischen Wertes bar. Die Methode selbst besteht darin, daß in die Tiefe des Darmes $^1/_2$ ccm einer von der Cyste eines Rindes, Hammels oder eines anderen Tieres herrührenden und da steril entnommenen Hydatidenflüssigkeit eingeimpft wird. An der Impfstelle erscheinen, ganz verschieden von Fall zu Fall, schon nach wenigen Minuten (Frühreaktion) bis nach wenigen Stunden (Spätreaktion) Rötung, Wärme, Schwellung, Oedem und Schmerz. Außer diesen örtlichen Erscheinungen lassen sich zuweilen auch einige allgemeine beobachten, wie: Muskelschmerzen, Gelenkschmerzen, allgemeines Schwächegefühl, Fieber. Diese Reaktion, deren Mechanismus bekanntlich mit einer aktiven Anaphylaxie zusammenhängt, liefert einen hohen Prozentsatz positiver Befunde; fehlt sie aber in Fällen von auf anderen Wegen festgestellter Echinokokkose, so handelt es sich fast immer um eine Eitercyste oder um einen toten oder verkalkten Parasiten.

Die Komplementablenkung wird nach der klassischen Methode ausgeführt, indem man nämlich das inaktivierte und zu $^1/_5$ verdünnte Blutserum zusammenbringt mit einer Hydatidenflüssigkeit, in Gegenwart frischen, auf $^1/_{10}$ verdünnten Meerschweinchenserums, und dann das gemeinsame hämolytische System hinzufügt, Hämolysin und rote Blutkörperchen. Die Reaktion, der derselbe Mechanismus und dieselbe Technik zugrunde liegt wie bei der gewohnten Wassermannschen Serodiagnose, besitzt alle Vorteile und leidet an denselben Unvollkommenheiten wie die Wassermannsche Reaktion selbst.

Während meiner Tätigkeit in den Krankensälen und im Pathologischen Institut des Ospedale zu Venedig habe ich kürzlich Gelegenheit gehabt, einen Fall von Echinokokkenerkrankung der Leber zu studieren, bei dem das Verhalten der Immunitätsreaktionen vor und nach dem Operationsakt äußerst interessant war. Nachstehend kurzer Krankheitsbericht:

C. N., 41jährig, aus Ponte di Piave; Aufnahme 22. 9. 1923. Persönliche und Familienvorgeschichte negativ. Krankheit begann vor 2 Jahren mit einem Gefühl von Schwere im Epigastrium, mit stark juckender Urticaria, hartnäckiger Stuhlverstopfung und hin und wieder mit Erbrechen. Diese Symptome wurden vom Arzt einer bestehenden Atonie des Magens nebst Magenerweiterung zugeschrieben, die eine äußerst strenge Diät verlangten. Niemals Schmerzen mit festem Sitz, niemals Kolikanfälle, der Kranke versichert, nicht übermäßig im Essen und Trinken gewesen zu sein.

Obj. Befund. Ernährungszustand gut. Unterhautfettgewebepolster mittelmäßig, Haut und Schleimhäute rosig. Keine bemerkenswerten Lymphdrüsen. Respiratorischer und kardiovaskulärer Apparat negativ. Abdomen geschmeidig und in allen Teilen ziemlich eben; leichte Gefäßzeichnung an den Seiten. Magen bei Abtastung schmerzlos, stark erweitert und leicht gesenkt, erreicht in sanftem Abstieg die Linea umbilicalis transversa. Leber stark vergrößert, tritt um ungefähr 2 Finger-Breite über den Rippenbogen längs der mittleren Clavicularlinie mit sich weich anfühlendem, bei Druck schmerzlosem Rand hinaus. Die Milz ist aus ihren Grenzen herausgetreten und im Hypochondrium fühlbar, hat an Volumen zugenommen und etwas auch an Konsistenz. Nierenptosis III. Grades rechts ohne Schmerzhaftigkeit dieses Organes bei Betastung. Coecum-Colonsegment gesenkt und deutlich fühlbar. Colon sigmoideum erweitert und prall gefüllt von stauenden Kotmassen. Bei der Röntgen-Untersuchung ergibt sich, daß die bedeutende Volumenszunahme der Leber dem Vorhandensein einer ungeheuren, trüben, stark wuchernden, rundlichen Masse zuzuschreiben ist, die mit konvexen Oberflächen auf der oberen und unteren Oberfläche des Eingeweides lagert und dabei den Magen und die Darmmasse überragt. Die Probemahlzeit ergibt kleine Mengen von Chlorwasserstoffsäure und Gegenwart von Milchsäure.

Dichtigkeit des Urins 1010, saure Reaktion, Eiweiß und Zucker nicht vorhanden, kein Uebermaß von Indikan, keinerlei abnorme Pigmente, Harnstoff = 8,30 $^0/_{00}$. Die Echinokokkuskomplementablenkung gibt eine stark positive Reaktion (++++ komplette Hemmung).

Der Prozentsatz der eosinophilen Zellen ergibt sich aus nachfolgender Leukozytenaufstellung:

Vielkernige neutrophile Zellen	70	**Proz.**
„ eosinophile „	30	„
„ basophile „	2	„
Große einkernige „	5	„
Lymphzellen	12	„
Uebergangsformen	8	„

Bei Feststellung des Prozentsatzes und verschiedenem Abstand von den Mahlzeiten ergab sich für die eosinophilen Zellen immer ein zwischen 2 Proz. und 4 Proz. schwankender Satz.

Die zweimal mit Abstand von 10 Tagen wiederholte Casonische Intradermoreaktion ist schon nach wenigen Stunden glatt positiv, wird es innerhalb 24 Std. ganz intensiv und geht erst vom 3. Tage nach der Inokulation zurück. Die Intensität der Reaktion war so bedeutend und mit so deutlichen örtlichen, geradezu erysipelartigen Erscheinungen verbunden, daß man zuerst an die Möglichkeit einer Verunreinigung der Infektionsflüssigkeit trotz ihrer Klarheit dachte, weshalb der Versuch unter strengster Kontrolle der Kultur wiederholt wurde, jedoch mit gleichem Erfolg.

An der Hand dieser Tatsachen wird die Diagnose auf Echinokokkenerkrankung der Leber gestellt. Der auf Totalausschälung der Zysten gerichtete operative Eingriff bestätigte vollauf die gestellte Diagnose.

12 Tage nachher werden die 3 vorerwähnten grundlegenden Untersuchungsmethoden nochmals erprobt. Die eosinophilen Zellen schwanken wiederum beständig zwischen 2 Proz. und 4 Proz. Die Intradermoreaktion ist ebenso positiv. Die Ablenkung des Komplements dagegen läßt eine leichte, aber deutliche Verminderung der Intensität erkennen.

Aus dem Vorstehenden geht hervor, daß bei diesem Fall unser besonderes Interesse verdienen:

1. Das Fehlen einer Eosinophilie, die, wie ich sagte, andererseits so häufig ist, daß sie für einige deshalb pathognostische Bedeutung erlangt. Auch ist die Vermutung von der Hand zu weisen, daß nur eine transitorische oder flüchtige Eosinophilie (schubartige Eosinophilie) entgangen sein könnte, denn ich habe — und es ist wohl das 1. Mal, daß eine derartige Vorsichtsmaßregel getroffen worden ist — es nicht versäumt, die Untersuchung auf alle die biologischen Versuche auszudehnen, in denen eine Eosinophilie stattfinden kann, z. B. nach den Mahlzeiten, im nüchternen Zustand usw. — 2. Das Fortbestehen eines anaphylaktischen Zustandes auch nach erfolgter Ausschälung der Zyste, der deutlich gekennzeichnet war durch das Andauern der positiven Casonischen Reaktion. — 3. Die Verminderung der Ambozeptorenfähigkeit des Serums nach dem operativen Eingriff, die erwiesen war durch das fortwährende Schwächerwerden der Komplementablenkungsreaktion.

Vom Standpunkt der Eosinophilie aus tritt demnach mein Fall in die wirklich nicht geringe Reihe derer ein, bei denen der Echinokokkus keine Eosinophilie erzeugt.

Auch die Nachforschung nach einem möglichen Weiterbestehen eines anaphylaktischen Zustandes nach erfolgter Abtragung des Parasiten ist nicht ganz neu. Es ist mir nicht überflüssig erschienen, einen Versuch auch so anzustellen, nicht nur um die kleine Zahl derartiger früherer Untersuchungen zu vermehren, sondern auch deshalb, weil die Möglichkeit des sicheren Nachweises eines solchen Fort-

bestehens jeden, der eine Echinokokkose in postoperativer Phase lautende Diagnose zu stellen im Begriffe ist, darauf hinweist, daß die biologische Reaktion auch dann positiv bleiben kann, wenn das Individuum von der Krankheit tatsächlich nicht mehr befallen ist. Der vorliegende Fall scheint mir nun in dieser Richtung insofern ganz besonders geeignet, das es sich um eine einzige Zyste mit absolut und exklusiv endogener Entwicklung handelte, und auch die Vermutung nicht bestehen konnte, daß wir es da mit einer abgesprengten oder übergebliebenen Zyste zu tun haben könnten.

Bezüglich der Intensitätsabnahme bei der Absorptionsprobe des Alexins kann man meines Erachtens doch wohl an eine wirkliche Verminderung der zirkulierenden Antikörper denken, wenngleich die Abnahme dieser dadurch noch mehr verlangsamt wird, daß aus der Operationswunde, noch lange nach erfolgtem Eingriff, die Ausstoßung bis dahin zurückgebliebener Zysten erfolgte. Sollte dies auch von anderen Forschern bestätigt werden, so wäre damit eine Tatsache von ungeheurem theoretischen und praktischen Wert erwiesen. Leider ist es auch mir aus meinem Willen nicht unterstehenden Gründen nicht gelungen, mit der nötigen festen Bestimmtheit den in Frage stehenden Befund nachweisen zu können.

Mein Befund erscheint mir trotz alledem bemerkenswert, ganz besonders noch, wann er dem vorbesprochenen betreffs Andauern des anaphylaktischen Zustandes auch in postoperativer Phase, also bei nicht vorhandenem Parasiten, gegenübergestellt wird. Wenngleich nun die Tatsache noch nicht nachgewiesen ist, so läßt sich doch — ich wiederhole das — vermuten, daß das Abnehmen der ambozeptorischen Kraft des Serums den Toxinen der Parasiten gegenüber fortschreitend verlaufe, so daß es sich also denken ließe, daß nach nicht sehr langer Zeit das volle Verschwinden jeder Immunisationskraft zur Tatsache werden könnte. Sicher ist, daß die Abnahme des Schutzvermögens zuerst unvollständig abläuft und auf jeden Fall ziemlich langsam, genau dasselbe, was beim Allergievermögen der anaphylaktischen Hypersensibilität vorkommt, das sogar vom Ausschluß des Parasiten überhaupt nicht erschüttert zu werden scheint. Das dürfte besonders von dem Umstand abhängen, daß die Echinokokkeninfektion, wenigstens beim Menschen, ganz unbemerkt und sehr langsam vor sich geht. Es kommt da fast so etwas wie Symbiose zwischen dem aktiven und passiven Gast zustande, die den Organismus des einen nach den Anforderungen des anderen bildet, verändert und so sensibilisiert, daß auch nach dem Vertreiben des Parasiten der bewirtende Organismus auf lange Zeit hinaus das allergisch-anaphylaktisch-immunitäre Verhalten aufweist, das er fast beständig und definitiv angenommen hatte.

Herrn Prof. Dr. Cagnetto danke ich an dieser Stelle für seine wertvolle Beratung und Herrn Prof. Dr. Velo für die Ermöglichung des klinischen Studiums des Krankheitsfalles.

Oxyurenfortpflanzung im Darm ohne Reinfektion und Magenpassage.

[Aus dem Gesundheitsamt der Stadt Halle (Stadtmedizinalrat Prof. Dr. v. Drigalski).]

Von Dr. med. **Ernst Walther Koch,**

Assistenten am Gesundheitsamt der Stadt Halle.

Mit 6 Abbildungen im Text und 1 Tafel.

Die Zoologie hat sich im Laufe der letzten Jahrzehnte kaum noch mit den menschlichen Oxyuren beschäftigt. Nach den Arbeiten von Vix, von Küchenmeister u. a. um die Mitte des vorigen Jahrhunderts folgte 1876 eine sehr umfangreiche und außerordentlich gründliche Arbeit von Leuckart, die zum Standardwerk wurde, an dessen Ergebnissen zu rütteln, als ein sehr verfängliches Unternehmen gelten mußte. Die Zoologie wandte sich anderen, noch weniger erforschten Gebieten zu. Anders verhielt sich die Medizin. Das Interesse der Aerzte, die tagtäglich mit der Behandlung der Oxyuriasis zu tun hatten, wurde durch die mannigfachen Mißerfolge, die ihnen bei ihrer Tätigkeit beschieden waren, immer von neuem angeregt, Mittel und Wege zu suchen, um ihre Patienten von diesem — wie ganz nachdrücklich hervorgehoben werden muß — gar nicht so ganz gleichgültigen und bekannterweise außerordentlich hartnäckigen Leiden zu befreien. Wenn dieses Ziel bisher nicht in befriedigender Weise erreicht wurde — selbst das neueste Vademecum für die Kinderpraxis von Kleinschmidt berichtet ganz resigniert, daß die Therapie „leider meist nur Scheinerfolge“ ergibt — so hat dies sicherlich zum guten Teil seine Ursache darin, daß über die Lebensgewohnheiten und Existenzbedingungen der Oxyuren noch keine restlose Klarheit herrscht.

Insonderheit schienen die Chirurgen und Pathologen dazu berufen, diese Fragen weiterhin zu klären, war doch der Befund von Oxyuren im Wurmfortsatz etwas durchaus Alltägliches: Oft fand man Hunderte von Oxyuren in einer einzigen Appendix — man fand Oxyuren, die in die Schleimhaut „eingebohrt“ waren, man fand in der Schleimhaut Eier, die mehr oder weniger weit in der Entwicklung vorgeschritten waren, man fand alle möglichen Größen von Oxyuren nebeneinander, und der Verdacht wurde immer wieder ausgesprochen, ob nicht auch ohne eine Reinfektion oder, was ja das weitaus viel Häufigere sein muß, ohne eine dauernde Autoreinfektion, eine Vermehrung der Parasiten innerhalb des Darmtraktus möglich sei. Ueber den Verdacht hinaus zu einem zweifelsfreien Beweise gelangte man jedoch bei der Schwierigkeit der Materie nicht. Der Forschung entgegen aber stellte sich das gegen Küchenmeister gerichtete und vielleicht nicht ganz affektfreie Wort Leuckarts, daß er nicht anstehe, „die Behauptung einer direkten Aufzucht im Darme als eine ebenso überflüssige, wie unbewiesene und unwahrscheinliche Hypothese zu bezeichnen“.

Als normaler Lebensweg der Oxyuren wird angenommen, daß die Parasiteneier, die in besonders auffallender Menge in der Analgegend zur Ablage gelangen und schon hier einen wohlgeformten und lebhaft beweglichen Embryo enthalten können, durch die Finger des Wurmträgers — speziell in der Nacht — ab ano ad os fortlaufend direkt, oder durch infizierte Kleidung oder Nahrung indirekt übertragen werden und durch Mund und Speiseröhre in den Magen gelangen. Hier werden die Eischalen — insonderheit an der schon zum Ausschlüpfen der jungen Würmer prädestiniert erscheinenden Deckelgegend — angedaut, so daß es den jungen Embryonen unschwer gelingt, die Hüllen zu zersprengen, um schließlich im mittleren und unteren Dünndarm ihre parasitäre Tätigkeit zu beginnen. Der Hauptaufenthaltsort der erwachsenen Würmer ist der Dickdarm, der bei schwerer Infektion direkt „sammetartig“ von ihnen besetzt erscheinen kann.

Nach einigen Wochen sind die mit Eiern strotzend gefüllten Weibchen (ein Weibchen enthält, nach Leuckart etwa 12000 Eier!) zur Eiablage bereit und verlassen teils mit den Fäkalmassen, teils in „angeblich“ systematischen Wanderungen den Darm des Wirtes, um ihre Eier außerhalb des Rectums in der Analgegend abzulegen. — Das Auswandern einzelner

Oxyuren, d. h. das Erscheinen lebhaft beweglicher Weibchen außerhalb des Afters, ist eine allgemein bekannte Beobachtung. Genauere Angaben über die Mengen der abendlich auswandernden Tiere liegen freilich m. W. bisher nicht vor. — Auswandernde Männchen sind niemals beobachtet worden, auch sind die Männchen im Dickdarm selbst nur in ungleich geringerer Zahl vorhanden.

Da sowohl die „auswandernden" wie die mit dem Kote entleerten Oxyuren meist sehr bald ihre Eier ablegen, hatte sich die Auffassung herausgebildet, daß die Eiablage — insonderheit die Kontraktionen der Uteri — erst hervorgerufen werden durch die Einwirkung der äußeren Agentien. Das Licht, an das schon Leuckart bei seiner Arbeit gedacht hatte, wurde noch von ihm selbst als veranlassender Faktor abgelehnt. So kam, da der Darm im wesentlichen als anaerob anzusprechen ist, in erster Linie der Sauerstoff der Luft als wehenerregendes Mittel in Frage, ohne dessen Wirkung man die Eiablage nicht für möglich hielt. Da sich aber auch in soeben erst entleertem Kote Eier befanden, die — im Gegensatz zu frisch abgelegten — schon fertig ausgebildete, wurmähnliche Embryonen enthielten, kam man (notwendigerweise) zu der Anschauung, daß nicht nur die Oxyuren systematische Wanderungen darmabwärts zum After hin ausführen und sich dort dem Sauerstoff der Luft aussetzen, sondern daß auch Rückwanderungen in den Darm hinein stattfinden und die Eier wenigstens z. T. dort abgelegt werden. Ob freilich die Rückwanderung nach Minuten oder nach Stunden vor sich gehen sollte und ob die Auswanderungszeit wohl genügen könnte, um eine bleibende, kontraktionserregende Reizung der Uteri zu veranlassen, darüber liegen bisher keinerlei Beobachtungen vor. Aufgefallen war lediglich die Tatsache, daß die Tiere nach einiger Zeit nicht mehr aufzufinden waren, und vielleicht hat man auch aus diesem schließlichen Unsichtbarwerden auf die Rückkehr in den Darm hinein geschlossen.

Hauptfragestellung.

Für mich als Arzt war die biologische Hauptfrage, um die sich meine folgenden Untersuchungen gruppierten, die, ob die Oxyuren tatsächlich ihre Eier im Darm selbst ablegen können und ob gegebenenfalls eine Aufzucht der aus diesen Eiern evtl. auskriechenden Larven innerhalb des Wirtsdarmes möglich ist.

Wachsen nämlich die jungen Parasiten nicht unmittelbar neben ihren Muttertieren an Ort und Stelle auf, so würde eine einfache, aber konsequent durchgeführte „Asepsis"[1]) genügen, um die Wurmträger von ihrem Leiden zu befreien und alle Therapie würde überflüssig werden (was der z. Zt. herrschenden Auffassung entspricht). Findet sie aber statt, dann sind wir außer der auf alle Fälle notwendigen Sauberkeit unter allen Umständen zu einer besonderen Behandlung gezwungen.

Eigene Untersuchungen.

Das Verhalten der auskriechenden Würmer.

Ich begann meine Untersuchung mit der Beobachtung der abendlich auskriechenden Oxyuren und setzte mich zu diesem Zwecke wochenlang an die Betten oxyuriatischer Kinder, die ich mir (10 Kinder) in einer geschlossenen Abteilung durch Stuhlbeobachtungen ausgesucht und zum Zwecke einer genauen Kontrolle in einen besonderen Saal verlegt hatte. Ich sammelte alle 10—15 Min. die auswandernden Tiere und notierte getrennt die entsprechenden Zahlen. Ich konnte daraufhin zunächst bestätigen, daß in der Tat ein auffallendes Maximum von Auswanderern in den ersten

1) Das kurze Wort „Asepsis" wird in diesem Zusammenhange nur im Sinne einer gesicherten Ausschaltung des Autoreinfektionsweges ab ano ad os gebraucht werden!

Nachtstunden erscheint. Dabei ist zu bemerken, daß das Auswandern nicht an gewisse Nacht- bzw. Tageszeiten direkt gebunden ist, sondern daß die Auswanderung im allgemeinen etwa $^1/_2$ Std. nach dem Zubettgehen allmählich einsetzt und sich auf 2—3 Std. erstreckt, vorwiegend freilich bei einer um 8 Uhr beginnenden Nachtruhe auf die Zeit von 9—11 Uhr abends.

Die Mengen der auskriechenden Tiere sind außerordentlich verschieden und stehen naturgemäß in direktem Zusammenhang mit der Schwere der Infektion und dem Entwicklungszustand der jeweilig vorhandenen Oxyuren. So ist es eine auch dem Laien bekannte Tatsache, daß oft, besonders im Anfang, die Oxyuren 8—10 Tage lang im Kote beobachtet wurden, nach dieser Zeit gänzlich verschwinden können, was meist als Erfolg irgendeiner Therapie gebucht wird, daß sie aber nach Verlauf von einigen Wochen dann wieder in ganz gleicher Weise in Erscheinung treten. So kommt ein durch das jeweilige Heranwachsen einer neuen Generation bedingtes, ziemlich regelmäßig intermittierendes Auftreten der Oxyuren zustande, das sich freilich oft im Laufe der Zeit verwischt, um einer mehr oder weniger kontinuierlichen, aber in der Stärke mitunter sehr schwankenden Oxyuriasis Platz zu machen.

Bei meinen Beobachtungen war nun eine abendliche Auswanderung von 30—40 Tieren, selbst bei einer sich im Stuhlgang nur sehr mäßig bemerkbar machenden Infektion, ein ganz alltäglicher Befund. In einem Falle zählte ich 54, die Höchstzahl aber, die ich feststellen konnte, war 65 Auswanderer innerhalb eines Zeitraumes von knapp 3 Std. Dabei muß ich hervorheben, daß ich damals keinen einzigen Fall in Beobachtung hatte, bei dem der Stuhl, wie man sich auszudrücken pflegt, von Oxyuren „wimmelte". Es ist also damit zu rechnen, daß diese Zahlen gelegentlich noch weit überholt werden dürften.

Ich führte nun Messungen dieser Tiere aus und konnte feststellen, daß sie zwar vorwiegend von maximaler Größe (8—10 mm) waren, daß aber der Befund kein ganz übereinstimmender war, daß ich vielmehr oft zu 20—25 Proz. auf jüngere Tiere stieß, die nur eine Länge von 4—7 mm hatten. Es kann daher nur gesagt werden, daß die Auswanderer fast ausschließlich — wenigstens aber zu 75—80 Proz. — ausgewachsene, mit Eiern bis zum äußersten angefüllte Weibchen waren, die alsbald außerhalb des Afters mit der Eiablage begannen. Diese vollzog sich in ganz charakteristischer Weise. Die Tiere verlassen lebhaft beweglich die inneren Schleimhautfalten und kriechen in den Analfalten der äußeren Haut vorwärts, bis sie an die Grenze der hier herrschenden Feuchtigkeit gelangen; d. i. im allgemeinen im Höchstfalle eine Strecke von 2—3 cm[1]). Hier verlieren sie bei beginnender Austrocknung und zunehmender Abkühlung ihre Beweglichkeit, kleben fest und legen nun mit außerordentlicher Geschwindigkeit ihre Eier ab, die etwa an der Grenze zwischen vorderem und mittlerem Drittel des Wurmes aus der dortselbst befindlichen Vulva ausgestoßen werden. Die Eier heben sich sehr bald als ein außerordentlich imposanter grellweißer Haufen von der Unterlage ab, an dem der Wurm selbst — bei flüchtigem Hinsehen — kaum noch erkannt wird; jedenfalls hängt er

1) Bei starkem Schwitzen der Kinder liegen die Verhältnisse naturgemäß anders. Die Würmer können dann bedeutend größere Strecken zurücklegen.

daran als eine unscheinbare zusammengeschrumpfte, durchsichtige Appendix (vgl. Abb. 1). Bei ganz plötzlicher Austrocknung werden die Eier sogar in langen, sich schlängelnden, girlandenähnlichen·Bändern ausgestoßen. Das Bild erinnert dann unmittelbar an die regenwurmförmig zusammenhaftenden Sandmassen, welche der Sandwurm an der Nordsee neben dem von ihm gebildeten Trichter ausstößt. Auch im Verhältnis zu ihnen sind die mütterlichen Oxyuren recht unscheinbar. Das wird ohne weiteres verständlich, wenn man sich vergegenwärtigt, daß ja die weiße Farbe der Würmer lediglich herrührt von den in ihnen befindlichen Eiermassen (12000!), die durch die dünne, glasige Wand hindurchscheinen. Die Eiablage selbst geht in direkter Abhängigkeit von den Feuchtigkeitsverhältnissen manchmal langsamer, manchmal schneller vonstatten. Sie ist aber durchschnittlich abgeschlossen in etwa 15—20 Min. Die einzelnen Eipakete und Eigirlanden halten zunächst infolge der den Eiern physiologisch anhaftenden Feuchtigkeit ganz gut zusammen, bald aber werden sie durch die Bewegungen der Gesäßbacken symetrisch auf diesen flach verteilt und die Einzeleier fallen, soweit sie nicht in der Analfeuchtigkeit kleben bleiben, schließlich auf das Bett, oder werden von den Sachen abgestreift.



Abb. 1. Links 2 legereife Oxyurenweibchen; in der Mitte ein annähernd ausgelegtes, mit großem Eipaket; rechts 2 vollständig ausgelegte Tiere (Vergr. 2fach).

Den Würmern selbst, die in der Trockenheit sehr bald absterben, geht es ganz entsprechend. Jedenfalls aber erkennt das unkundige Auge in den ausgelegten leblosen, zusammengeschrumpften Schläuchen nicht mehr die lebhaft beweglichen und weißglänzenden, auskriechenden Oxyuren. So kommt es, daß die Tiere scheinbar verschwunden sind — in Wirklichkeit sind sie von der Haut ihres Trägers abgefallen oder kleben noch in irgendeiner Analfalte — aber so vollständig verändert, daß selbst mir, der ich doch Abend für Abend danach suchte, die Identifizierung mitunter nur unter Zuhilfenahme des Mikroskopes möglich war.

Etwas different hiervon verhalten sich die Tiere, die sich speziell bei Mädchen zufällig nicht nach der Wirbelsäule und den Gesäßseiten hin, sondern nach der Genitalgegend zu begeben. Diese Tiere, die eben zufällig in den mehr ventral gelegenen Analfalten vorwärtskrochen, müssen naturgemäß einen verhältnismäßig hohen Prozentsatz der Auswanderer überhaupt darstellen. Trotzdem war ich einigermaßen überrascht, festzustellen, daß in einem Falle im Laufe von nur 2 Std. von 43 auskriechenden Weibchen sich 16 zu den Genitalien begaben und hier zwischen den großen und kleinen Labien und selbst in der Klitoris- und Mons pubis-Gegend umherkrochen. Die knappe Hälfte von ihnen drang sogar ins Vestibulum ein und verschwand durch die Hymenalöffnung lebhaft beweglich in den Falten der Vagina. — Da die Anal- und Genitalfeuchtigkeitszonen unmittelbar ineinander übergehen, behalten

die in die Genitalgegend kriechenden Tiere ihre Beweglichkeit bedeutend länger — die **forcierte** Eiablage setzt auch hier erst ein, wenn die Tiere der Austrocknung anheimfallen, was meist nicht in den Tiefen der Interlabialfalten und wohl auch nicht der Vagina, sondern an der Oberfläche der Labien und in der Mons pubis-Gegend erfolgt. Die Zeit bis zum Erscheinen der großen Eipakete und dem Absterben der Würmer ist jedenfalls hier eine bedeutend größere; noch $^3/_4$ Std. nach dem Verlassen des Afters fand ich innerhalb der Genitalsphäre recht lebhaft bewegliche Oxyuren. Die in die Vagina eingedrungenen Tiere entzogen sich natürlich weiteren Beobachtungen. Ich zweifle nicht daran, daß sie ihre Eier dortselbst — allerdings mehr verstreuend, als zu einem Pakete zusammengeballt — ablegten; ihre Beweglichkeit werden sie sicher, der fast optimalen Feuchtigkeit entsprechend, noch verhältnismäßig recht lange beibehalten haben, so daß die Berichte über gelegentliches solitäres Vorkommen von Oxyuren resp. Oxyureneiern im Uterussekret (Vix), im Cervicalkanal, in den Tuben (Strassen, Tschammer, Maro) und selbst in der freien Bauchhöhle resp. im Beckenperitoneum (Chiasi, Schneider, Strata, Kolb) in keiner Weise zu überraschen brauchen, und der Einwanderungsweg in diesen zitierten Fällen durch die Vagina und nicht etwa durch die Darmwand unzweifelhaft erscheint.

Bei Knaben bewegten sich die Oxyuren nie nennenswert über die den Schenkeln anliegenden feuchten Skrotalteile hinaus. Penis, Praeputium, Harnröhre blieben durchweg frei.

Vergegenwärtigt man sich nun das außerordentlich peinigende Juckgefühl, welches die Oxyuren schon in der Aftergegend hervorrufen — was mitunter zu ganz rigorosen Kratz- und Abwehrbewegungen der Träger führt — so bekommt man in Anbetracht der gemachten Zahlenangaben wohl eine Vorstellung von der mitunter ganz außerordentlichen Belästigung, die speziell die Mädchen von ihren in die Genitalsphäre eingedrungenen Parasiten erleiden müssen. Die Nachtruhe wird in schwerster Weise gestört, und zur Behebung und wenigstens zeitweiligen Linderung des Juckgefühls müssen die Kinder ja naturnotwendig ihre Hände dauernd in der Anal- und der ja noch ungleich sensibleren Genitalgegend haben. Das aber führt nicht nur zu einer dauernden Autoreinfektion, sondern auch fast mit Sicherheit zu einer ausgiebigen und frühzeitigen onanistischen Betätigung, von deren Umfänglichkeit man sich im allgemeinen keinen rechten Begriff machen dürfte, wenn man annimmt, daß nur ab und zu — in Ausnahmefällen — sich einmal 1 oder 2 Würmer in die Genitalgegend verirren. Als ich die mir bei meinen Untersuchungen zur Hand gehende Leiterin der Abteilung (bei dem oben zitierten Falle) auf eine gerade sehr instruktive Massenüberwanderung von Oxyuren zu den Labien und in die Vagina hinein aufmerksam machte und auf die Onaniegefahr hinwies, konnte sie mir mitteilen, daß ihr gerade dieses Kind — es handelte sich um ein etwa 9jähriges Mädchen — im Laufe der letzten Wochen von den anderen Kindern 4mal wegen onanistischer Betätigung gemeldet worden war und allen Beeinflussungsversuchen gegenüber hatte sich das Kind — verständlicherweise — durchaus rückfällig benommen.

Die Frage der Rückwanderung der auskriechenden Würmer.

Wenn nun auch das vollständige Ablegen der auskriechenden Weibchen außerhalb des Afters sicherlich die Norm darzustellen pflegt, so

war es doch immerhin denkbar, daß wenigstens einzelne Tiere in den Darm zurückkriechen und hier die Eiablage vollenden.

Leuckart vermutete, daß die jungen Weibchen nach einer zeitweiligen äußeren Einwirkung der äußeren Agentien zurückkehrten, und daß nur die alten Tiere mit vollständig erschöpften Eierstöcken ihre Eier außerhalb deponierten. (Leuckart hält eine mehrmalige Begattung der Oxyuren für wahrscheinlich.)

Um ein Urteil über die wirklichen Verhältnisse zu bekommen und evtl. gesicherte Mitteilungen über die Zeiten machen zu können, die sich die Würmer dem Sauerstoff der Luft aussetzen, folgte ich zunächst einer Anregung Prof. Fülleborns (Hamburg) und versuchte, Serienfärbungen von Würmern durchzuführen, indem ich alle Viertelstunden einen anderen Farbenspray über die auskriechenden Würmer spritzte. Der Gedanke war der, nun in regelmäßigen Abständen nachzusehen, wieviel rote, grüne, blaue usw. Würmer sich noch außerhalb des Afters befanden. Hieraus wäre unter Umständen ein Rückschluß auf die individuelle Auswanderungsdauer möglich gewesen. Der Versuch erwies sich jedoch als undurchführbar, da bei der in der Analgegend herrschenden Feuchtigkeit die Farblösung sich sofort diffus verteilte, an den Würmern selbst die Farbe aber nicht mehr recht zu erkennen war — vor allem aber deswegen, weil die nachkriechenden Würmer immer wieder durch die verteilte Farblösung hindurchkrochen und sich schließlich in nichts mehr von ihren Vorgängern unterschieden. Auch der Versuch, die Würmer viertelstündlich mit Farbtupfen mittels eines Stäbchens oder Pinsels zu bezeichnen, schlug fehl, da auch auf diesem Wege die Farblösung sich sofort ausbreitete. Außerdem sind die Farben immerhin differente chemische Gebilde, die wohl eine Abänderung des physiologischen Verhaltens der Würmer herbeiführen konnten. Ich gab schließlich die Färbeversuche vollständig auf und verfuhr nach eigener Methode, wie folgt: Ich verfertigte mir individuelle Schemata der zu beobachtenden Analgegenden und zeichnete nun fortlaufend — immer in Abständen von 5—10 Min. — Situationsbilder, indem ich jeden neuen, bei Entfaltung der Analschleimhaut gerade auftauchenden Wurm mit einer fortlaufenden Nummer notierte und auf den folgenden Bildern nun den Ort, den dieser Wurm inzwischen erreicht hatte, mit einem kleinen, entsprechend numerierten Pfeile markierte. Da ich mir zu diesen Beobachtungen Kinder aussuchte, die nach längerer Beobachtung nur mäßig verwurmt waren, blieb die Uebersichtlichkeit vollständig gewahrt, und eine Vergleichung der gezeichneten „Filmbilder“ ermöglichte einen genauen Ueberblick über die Wege, die innerhalb genau notierter Zeiten die Würmer außerhalb des Afters zurücklegten. Auch die Richtung, in der sich die Würmer bewegten, wurde stets durch die entsprechend angebrachte Pfeilspitze eindeutig festgelegt.

Es muß nun auf Grund zahlreicher Beobachtungen dieser Art jedwede Rückkehr von Würmern in den Darm hinein vollständig ausgeschlossen werden. Ich sah nicht in einem einzigen Falle und nicht in einer einzigen Phase der Beobachtung die Tiere sich zum After hinbewegen, sondern sich stets nur, soweit sie sich überhaupt noch bewegten, von ihm entfernen. Natürlich braucht hierin nicht irgendeine „Absicht“ der Würmer zu liegen, das Darmmilieu unter allen Umständen zu meiden, sondern die Sache liegt eben so, daß die Würmer in den nach außen

verlaufenden tiefen Analfalten vorwärtskriechen und diese Richtung auch auf der Haut zunächst noch beibehalten. Die Wirkung der äußeren Agentien setzt dann ziemlich rasch ein, die Austrocknung beginnt, die Würmer werden unbeweglich und legen, oder besser gesagt, pressen in höchster Eile ihre Eier aus, ohne überhaupt Zeit zu finden, ihre Marschrichtung noch wesentlich zu ändern. Die Tiere andererseits, die nach den Genitalien zu wandern und nicht so schnell der Austrocknung verfallen, würden wohl die temporäre Möglichkeit haben, zurückzukehren, sie sind aber inzwischen schon so weit vom After entfernt, daß schon a priori ein Zurückfinden recht unwahrscheinlich erschien. Dem entsprach durchaus die Beobachtung: auch von diesen Tieren bewegte sich niemals eines zum After zurück.

Etwas verschieden hiervon verhielten sich lediglich die Weibchen, die bei breiter Entfaltung des Schleimhauttrichters, also noch ohne bisher nennenswert den Außenwirkungen ausgesetzt zu sein, gerade in der Tiefe auftauchten, sofern ich sie bei den Färbeversuchen mit einem Glasspatel oder einem Pinsel berührte. Sie drehten mitunter mit einer äußerst energischen Bewegung des ganzen Körpers um und entschwanden wieder der Beobachtung. Ich vermute freilich, daß sie schließlich doch wieder irgendwie nach außen gekommen sein werden; jedenfalls kann man die starke Abkühlung, der bei einer plötzlich extremen Entfaltung des Anus die bis dahin vollständig körperwarmen Tiere ausgesetzt sind, wie die ungewöhnliche Berührung selbst unter keinen Umständen mehr mit den physiologisch auf die allmählich und ungestört auskriechenden Würmer einwirkenden Einflüssen vergleichen, und die Feststellung, daß keinerlei Rückwanderung der Würmer stattfindet, kann dadurch in keiner Weise eingeschränkt werden.

Die Frage der aktiven Auswanderung der Oxyuren.

Nachdem so die Frage der Rückwanderung im allgemeinen und gar die einer systematischen, absichtlichen, insbesondere in vollständig negativem Sinne entschieden werden konnte, war es naheliegend, auch die Behauptung einer eigenwillig zielbewußten Darmabwärtsbewegung und Auswanderung der legereifen Oxyuren einer Nachprüfung zu unterziehen. An der Tatsache, daß die nächtlichen Auswanderer überwiegend legereife Weibchen, die bis zum Platzen mit Eiern angefüllt, waren, war freilich keinerlei Zweifel möglich. Auch war es schließlich denkbar, daß ein von den Eiern ausgehender mechanischer oder chemischer Reiz die Tiere zum „Wandern“ veranlassen könnte. Die Vorstellung aber, daß nun diese kleinen $^3/_4$—1 cm langen Tiere, die sich im oberen Dickdarm „normalerweise“ massenhaft aufhalten, durch das Labyrinth von Schleimhautfalten hindurch den ganzen Dickdarm — also einen recht beträchtlichen Weg — aktiv durchwandern sollten, ist immerhin nicht ganz einfach. Unvorstellbar ist es aber schlechterdings, daß die Tiere dabei zielsicher gerade die Richtung nach dem Sauerstoff verheißenden und darum, wie man annahm, allein wehenerregenden Darmende zu finden sollten. Es kam hinzu, daß es logischerweise notwendig ist, noch eine weitere, und zwar entgegengesetzte, Wanderung der Oxyuren bis zum Augenblicke der Eireife anzunehmen, da ja sonst schon die unreifen Tiere, die sich unter allen Umständen zur Nahrungsaufnahme im Kote aufhalten müssen, mit diesem in spätestens 2—3 Tagen nach außen befördert sein müßten. Um dem zu begegnen, müßten

also zunächst andauernde, zielbewußte Wanderungen darmaufwärts stattfinden, und diese Richtung müßte sich vom Augenblick der Eifülle und Eireife an in ihr Gegenteil verkehren! — Die übermäßige Kompliziertheit eines solchen Verfahrens ist offensichtlich. Eine vergleichende Betrachtung des anatomischen Baues der Würmer zu verschiedenen Lebensperioden ermöglicht aber m. E. eine ungleich einfachere und rein auf mechanischen Ursachen beruhende Erklärung für die Tatsache, daß nur die reifen Weibchen — und im wesentlichen diese allein — außerhalb des Afters zur Eiablage erscheinen.

Die noch nicht geschlechtsreifen Weibchen — vgl. zu den folgenden Ausführungen die Abb. 2, 3 u. 4 — sind außerordentlich einfach und übersichtlich gebaut. Man erkennt an ihnen im wesentlichen nur einen bei stärkerer Vergrößerung geringelt erscheinenden (bei den Abbildungen nicht zu erkennen) und an den Enden — besonders dem einen — ziemlich spitz verlaufenden Schlauch. Am Kopfende befindet sich eine wulstige, elastische Auftreibung, die die Mundöffnung allseitig umschließt. Sie sei, da das Wort „Lippen" bei den Nematoden schon für andere Gebilde vergeben ist (die übrigens bei Oxyuren nur andeutungsweise vorhanden sind), als akzessorischer Lippenwulst bezeichnet. Der Mund selbst setzt sich in einen langgestreckten Oesophagus fort, der sich etwa 1 mm lang geradlinig im Körper erstreckt. Am Ende des Oesophagus befindet sich ein kugeliges Gebilde, das von einigen als Pharyngealbulbus, von anderen als Muskelmagen bezeichnet wird und Verschlußmöglichkeiten sowohl nach dem Oesophagus wie nach dem Magen zu hat. Der Darm selbst schließt sich als ein langer, durch den ganzen Wurm erstreckender Schlauch unmittelbar an diesen Bulbus an und endet etwa am Ansatze des spitzen, „pfriemenartigen" Schwanzes, nicht eigentlich kaudal, sondern lateral. Hierzu kommt dann bei den geschlechtsreifen Tieren die Ausbildung der Geburtswege: der Eierstöcke, der Eileiter, der Uteri, der

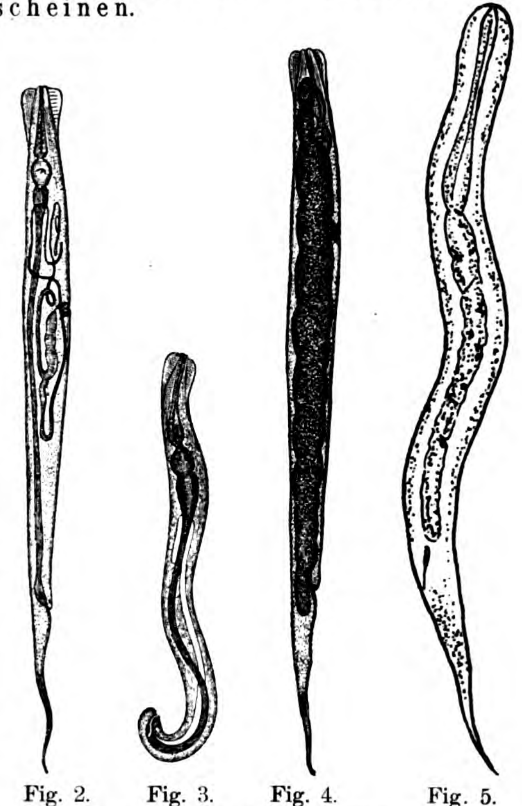


Fig. 2. Fig. 3. Fig. 4. Fig. 5.

Abb. 2. Geschlechtsreifes Weibchen (Länge 10 mm).
Abb. 3. Geschlechtsreifes Männchen (Länge 4 mm).
Abb. 4. Legereifes Weibchen (Länge 10 mm).
Abb. 5. Oxyurenlarve vor der ersten Häutung, kein Lippenwulst, kein Pharyngealbulbus. (Länge von 0,15—1,5 mm.)

Erklärung der Tafelabbildungen.

Kopfteile verschieden alter Weibchen. (Vergr. etwa 20fach.)

Abb. 6—8. Noch nicht geschlechtsreife Weibchen. (Lippenwulst, Oesophagus, Pharyngealbulbus, Darm.)

Abb. 9. Geschlechtsreifes Weibchen. (Die Geburtswege schieben sich bis in den Kopfteil vor).

Abb. 10—13. Fortschreitende Eifüllung auch im Kopfteil. Oesophagus und Pharyngealbulbus deformiert und an die Wand gequetscht, damit funktionsunfähig geworden.

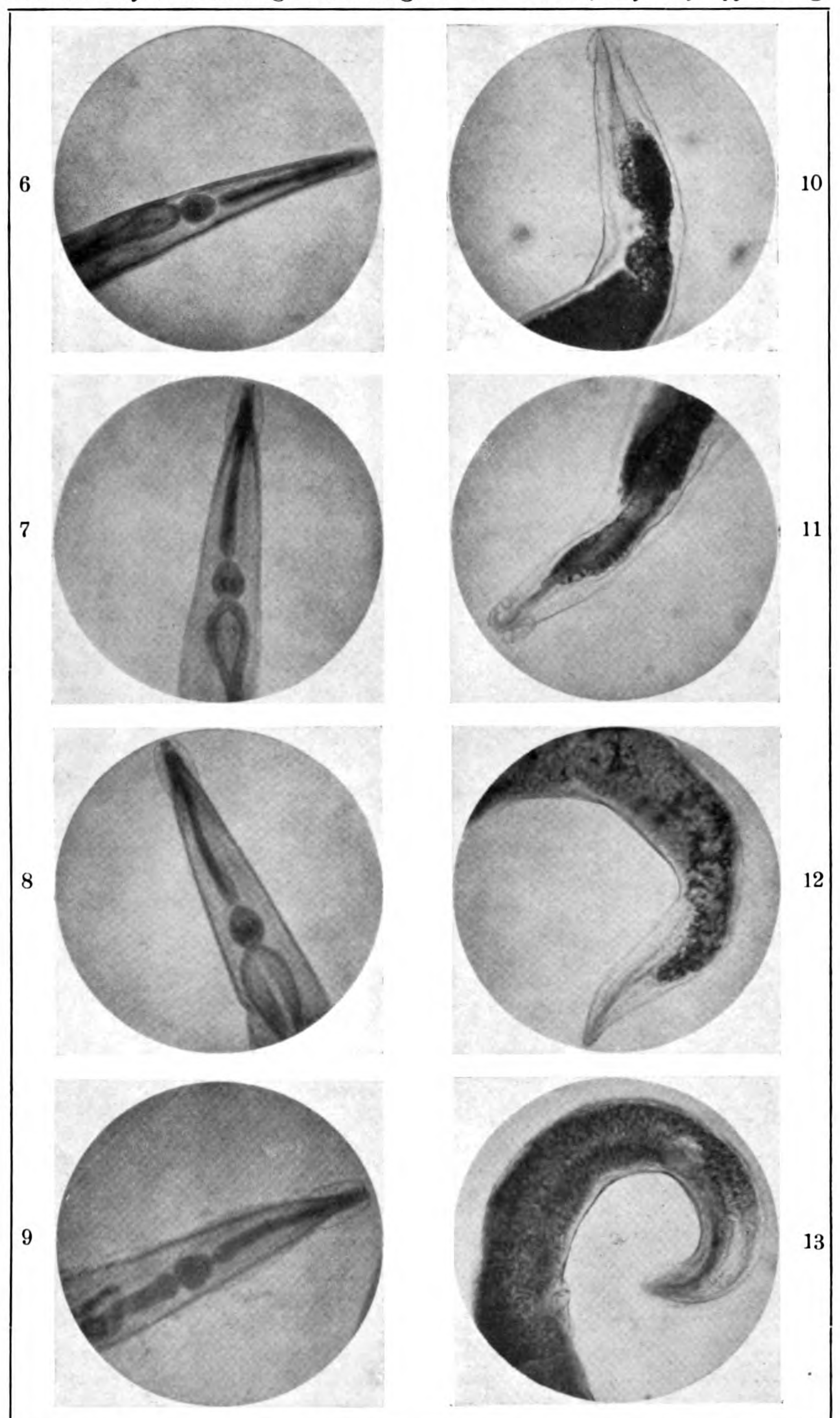
Bei Abb. 13 ist auch die Vulva erkennbar, die Spitze des Kopfes weist daraufhin.

Auf den Abbildungen 10—13 sind die Einzeleier, deren natürliche Größe 0,05 mm beträgt, gut zu erkennen. Die Eiermassen erscheinen bei durchfallendem Lichte dunkel. Der akzessorische Lippenwulst war bei 12 und 13 zwar auch vorhanden, er ist aber auf den Abbildungen — da in anderer Einstellungsebene gelegen — nicht zu erkennen

Vagina und einer, wie schon erwähnt, zwischen vorderem und mittlerem Drittel des ausgewachsenen Tieres gelegenen Vulva. Das imposanteste Gebilde aller dieser Teile ist zweifellos bei den noch jugendlichen Tieren der Pharyngealbulbus, der durch seine außerordentliche Größe sofort auffällt (vgl. Abb. 2 und 3 und 6—9). Er nimmt annähernd den gesamten Querschnitt des Wurmes ein und besteht aus einer elastischen (gummiballartigen) Außenmembran mit innerhalb gelegener sehr kräftiger Muskulatur. Durch Anspannung und Erschlaffung dieser Muskeln wird die Größe des Hohlraums verändert. Entsprechend der Anordnung der Verschlüsse muß damit abwechselnd nach dem Darm zu eine Druckwirkung und nach dem Oesophagus zu eine starke Saugwirkung hervorgerufen werden. — Die Größe und Muskelstärke dieses Bulbus steht nun in auffallendem Gegensatz zu seinem Zwecke als Aufsaugungsapparat für die Nahrungsstoffe, da die wässerige Darmflüssigkeit des Oxyurenträgers sicherlich mit einem viel geringeren Aufwand von Kraft eingesogen werden kann, die ihrerseits schon hinreichend durch die Muskulatur des Oesophagus gewährleistet erscheint. Die Frage ist also naheliegend, ob nicht diesem Bulbus noch eine weitere Funktion zukommt.

Eine solche kann unschwer gefunden werden, wenn man dabei den akzessorischen oben erwähnten Lippenwulst mit in Betracht zieht.

Für diesen Lippenwulst, der, wie aus den Abbildungen hervorgeht, eine ganz respektable Größe besitzt, habe ich in der Literatur vergeblich nach einer plausiblen Funktion gesucht. Sicher ist, daß er für die von vielen Autoren berichteten angeblichen „Bohrbewegungen" der Oxyuren ein ausgesprochenes Hindernis wäre. Aber auch bei der Nahrungsaufnahme ist für seine Existenz kein stichhaltiger Grund einzusehen. Für die Aufsaugung der Darmflüssigkeit würde eine einfache Mundöffnung, wie bei jeder Wassersaugpumpe, vollständig genügen! Dieser gummikissenähnliche, den Mund allseitig umschließende, elastische Lippenwulst kann nur Sinn haben, wenn er mit dazu dient, den Wurm an eine Unterlage festzusaugen, denn dann kann er mit seiner anpassungsfähigen Form und Konsistenz den notwendigen sicheren Abschluß gegen die Umgebung herbeiführen. Und in diesem Zusammenhang bekommt auch die außerordentliche Ausbildung des Pharyngealbulbus ihren Sinn: seine zweite und nicht unwichtige Bestimmung ist — neben der Aufsaugung von Nahrungsstoffen — als Ansaugpumpe zu dienen, die imstande ist, den mit der Nahrungsflüssigkeit hinreichend gefüllten Wurm an der Schleimhaut des Wirtsdarmes zu fixieren und so die durchaus unerwünschte Heraus-



Verlag von Gustav Fischer in Jena.



beförderung mit dem darmabwärts dringenden Kote zu vermeiden. — Die durch die Ansaugung sich ergebende Situation aber könnte von mir gar nicht treffender illustriert werden als durch den bereits in der Literatur vorhandenen Vergleich, daß bei starker Oxyuriasis der Dickdarm direkt „sammetartig" mit den Parasiten besetzt erscheinen kann!!

Erst durch diesen so einfachen Mechanismus konnte der Darm überhaupt zum Daueraufenthaltsorte der Oxyuren werden. — Damit erübrigt sich natürlich auch das sonst unter allen Umständen zu fordernde Darmaufwärtswandern der prämaturen Würmer. —

Außerordentlich instruktiv ist in diesem Zusammenhang ein Hinweis auf den anderen verbreiteten Darmparasiten des Menschen, auf Ascaris lumbricoides. Dieses 10mal so große Tier kann bei geeigneter Lage im Darm mit ganz wenigen Schlängelbewegungen die durch die Darmperistaltik bedingte Abwärtsbewegung wieder ausgleichen — es benötigt daher keinen besonderen Ansaugmechanismus. — Dem entspricht durchaus sein anatomischer Bau. Sein Pharyngealbulbus ist so außerordentlich klein, daß man ihm unmöglich eine stärkere Saugkräfte benötigende Doppelfunktion zumuten kann! Und dem entspricht weiter — vollständig korrespondierend — seine andersartige und zum Ansaugen durchaus ungeeignete Kopfbildung, insonderheit aber das vollständige Fehlen dieses für Oxyuris (des Menschen) so charakteristischen akzessorischen Lippenwulstes!

Ich erinnere des weiteren an Ankylostoma duodenale, an die Trichinen, an Trichocephalus dispar — die Reihe ließe sich beliebig fortsetzen. Ueberall, wo ein wirkliches Einbohren, Durchbohren, Einfressen in Frage kommt, ist der Kopf des betreffenden Tieres spitz — ohne Lippenwulst — und überall, wo nur dünnflüssige Nahrung aufgesogen wird, findet sich kein nennenswerter Pharyngealbulbus. Wo kein Ansaugmechanismus benötigt wird, erübrigt seine Ausbildung — für Oxyuris aber ist er Lebensnotwendigkeit: die Funktion ist es, die sich den Körper baut!

Es fragt sich nun, wie das Erscheinen der legereifen Tiere am After zu erklären ist. Zu diesem Zwecke ist es notwendig, die noch nicht geschlechtsreifen Tiere mit dem legereifen Weibchen zu vergleichen. Die beigefügten Abbildungen 10—13 lassen erkennen, daß bei letzteren das Situationsbild ein gänzlich verändertes geworden ist. Durch die den Wurm schließlich bis zum äußersten anfüllenden Eier, die auch weit bis in den Kopfteil des Wurmes eindringen, verliert der Oesophagus seinen geradlinigen Verlauf; er wird an die Seite gequetscht und abgebogen. Vor allem aber wird der Pharyngealbulbus an die Wand gedrückt und vollständig zusammengepreßt! Damit muß er aber seine Fähigkeit verlieren, als Saugpumpe zu wirken, da er diese Funktion nur so lange erfüllen kann, wie seine extreme Erweiterung gewährleistet ist! Die Würmer können sich mithin in dem Zustand äußerster Eifülle, also der Legereife, nicht mehr an die Darmschleimhaut ansaugen, was notwendigerweise zur Entleerung der Parasiten mit den Fäzes des Trägers führen muß. Die Betrachtung der Abbildungen, die nicht etwa Ausnahmen, sondern den normalen Typus eiergefüllter Weibchen darstellen, dürfte die große Wahrscheinlichkeit, die meine Theorie für sich hat, ohne weiteres ergeben und die Entleerung vorwiegend legereifer Weibchen hinreichend erklären. An-

dererseits spricht das — freilich sehr spärliche — Auftreten noch nicht ganz legereifer Tiere nicht dagegen, denn eine geringfügigere Beeinträchtigung der Extensionsfähigkeit des Pharyngealbulbus liegt auch schon bei noch nicht extremster Eifüllung vor, und selbst davon abgesehen, wird es auch sonst reichlich Gelegenheiten und Zufälligkeiten geben, wo die rechtzeitige Ansaugung einige Male mißlang oder verabsäumt wurde und dadurch die vorzeitige Ausscheidung zustande kam.

Soll diese ungewollte Ausscheidung mit den Fäkalmassen nun auch die angeblich willkürlichen Auswanderungen hinreichend verständlich machen, so müßten einleuchtende Gründe für 3 verschiedene Arten der erfahrungsgemäß zur Beobachtung gelangenden Auswanderung beigebracht werden: 1. für die Auswanderung, resp. das durch die Würmer hervorgerufene Jucken, das sich bekanntermaßen unmittelbar an die Defäktion anschließt, 2. für die Massenauswanderungen in den ersten Stunden der Nacht und 3. für das gelegentliche Auftreten vereinzelter Würmer während des ganzen Tages, wie es von allen gut beobachtenden Wurmträgern berichtet wird.

Nun ist es verständlich, daß bei der Auspressung des mit Würmern mehr oder weniger beladenen Kotes Würmer, die sich an der Grenze zwischen Fäkalmasse und Schleimhaut befinden, je nach der Menge der überhaupt im Kote vorhandenen Tiere, mehr oder weniger zahlreich an der Darmwand zurückbleiben. Diejenigen Tiere nun, die ganz am Darmausgang, also im Bereiche des Musculus sphincter ani, abgestreift werden, müssen sich sehr schnell und gleich im Anschluß an die Defäkation durch ihre Bewegungen bemerkbar machen und zum Teil auch bis an die äußere Haut vordringen. — Etwas anders verhalten sich die Tiere, die sich weiter nach innen auf der Rektalschleimhaut befinden. Sie werden, ihren sonstigen Gewohnheiten entsprechend, ein planloses Umherkriechen beginnen, was freilich in dem röhrenförmigen Rectum notwendigerweise nach einiger Zeit zur Ausbildung zweier Hauptrichtungen führen muß — darmaufwärts und darmabwärts. Die Tiere, die darmaufwärts wandern, werden mit den nachfolgenden Kotmassen den Darm verlassen, die anderen werden in nur scheinbar absichtlicher, zielbewußter Auswanderung in die Aftergegend gelangen. Und zwar werden diese Tiere vorwiegend in den ersten Nachtstunden in Erscheinung treten, da sie im Laufe des Tages sowohl durch die Bewegungen der Nates, die sich, wenn auch in geringem Maße, doch irgendwie auf die Analgegend fortpflanzen müssen, wie auch durch die willkürlichen Sphincterkontraktionen rein mechanisch veranlaßt werden, die Sphincterengegend zu meiden, und damit nicht die Möglichkeit haben, nach außen vorzudringen. Wenn das auch im allgemeinen die Norm sein wird, so hindert es natürlich nicht, daß nicht doch einzelne Tiere trotz der Behinderung auch am Tage den Weg nach außen finden. Und tatsächlich verhält es sich auch so. — Eine Massenauswanderung aber kann erst in Erscheinung treten, wenn bei dem Träger Ruhe einsetzt, d. h. vorwiegend in den ersten Stunden der Nacht. Sie wird anhalten, bis die Rektalschleimhaut im wesentlichen von Oxyuren frei ist. Das scheint erfahrungsgemäß nach etwa 2—3 Std. der Fall zu sein; danach kommt es, weil nur noch einzelne Tiere in dieser Gegend vorhanden sind, nur noch zu solitären Auswanderungen ganz ähnlich, wie aus rein mechanischen Ursachen im Laufe des Tages.

Da damit die 3 wesentlichen eingangs bezeichneten Auswanderungsmodi ihre befriedigende Erklärung finden, kann m. E. die Vorstellung einer planmäßigen, systematischen, aktiven Auswanderung verlassen werden. Das Erscheinen der Oxyuren im Kot und außerhalb des Afters findet durchaus ohne Zielrichtung statt und ist lediglich durch mechanische Ursachen bedingt, bei denen naturgemäß die lebhaften Eigenbewegungen der Würmer eine hervorragende Rolle spielen.

Das zahlenmäßige Mißverhältnis zwischen Männchen und Weibchen.

In der außerordentlichen Bedeutung, die nach meiner Ueberzeugung dem Pharyngealapparat als Ansaugpumpe zukommt, findet auch eine Erscheinung ihre ungezwungene Erklärung, an der m. E. die Wissenschaft bisher ohne jeden Erklärungsversuch vorbeigegangen ist. Das ist das zahlenmäßig so verschiedene Auftreten von Männchen und Weibchen. Nach Leuckart kommen auf 1 Männchen 9 Weibchen, nach Rahner finden sich im Ileum Männchen und Weibchen annähernd in gleicher Zahl im Dickdarm, und im ausgeschwemmten Dickdarminhalte sind sogar 20mal mehr Weibchen vorhanden als Männchen, welcher letzteren Angabe ich allerdings nicht in vollem Umfang zustimmen möchte. Allgemein aber bekannt ist die Tatsache, daß im Kote und vor allem unter den Auswanderern eigentlich niemals ein Männchen angetroffen wird. Der Befund ist ein so markanter, daß man sich bis um die Mitte des vorigen Jahrhunderts die Vermehrung der Oxyuren überhaupt ohne männliches Zutun vorstellte.

Die anatomischen Verhältnisse liegen nämlich beim Oxyurenmännchen ganz wesentlich anders als beim Weibchen (vgl. Abb. 3). Seine Geschlechtsteile liegen ausschließlich am kaudalen Ende (einen eigentlichen Schwanz hat das Männchen im Gegensatz zum Weibchen nicht), und selbst bei extremster Füllung seiner langen, durch den Körper verlaufenden Hodenröhre nimmt dieselbe nicht mehr als höchstens die 2 „kaudalen“ Drittel des Wurmes ein. Oesophagus und Pharyngealbulbus werden nie deformiert und daher auch niemals irgendwie in ihrer Funktion beeinträchtigt, und somit haben die Männchen bis an die Grenze ihrer Vitalität die Möglichkeit, sich in den höheren Partien der Schleimhaut zu fixieren. Für die Richtigkeit dieser Auffassung spricht es auch, daß man der Männchen, deren Länge nur etwa die Hälfte, deren Volumen also höchstens $^1/_8$ desjenigen eiergefüllter Weibchen beträgt, am besten dadurch habhaft wird, daß man mit dem Messerrücken die Darmschleimhaut abschabt, bei welcher leichten Gewaltanwendung man natürlich die angesaugten Tiere mitabstreift. Nach dem Tode aber verfallen die Männchen der Verdauung und können kaum mehr als solche erkannt werden, geht doch nach Trumpp auch der Zerfall etwaiger, im lebenden Menschen absterbender Oxyurenweibchen sehr bald unter Bildung gallertartiger Klümpchen vonstatten. Schließlich aber wird aus diesem Mechanismus verständlich, daß man bei Abtreibung von Würmern (die ja fast stets zum mindesten in Verbindung mit Abführmitteln versucht wird) nur selten auf Männchen stößt, eine Tatsache, die zwar außerordentlich auffiel, aber bis in die neueste Zeit hinein vollkommen unerklärlich blieb. Abgeführt werden eben von den erwachsenen Tieren nur die ansaugungsunfähigen oder wenig-

stens ansaugungsschwachen eiergefüllten Weibchen, nicht aber die bis zu ihrem Tode saugstarken Männchen.

Luftsauerstoff und Eiablage.

Es ist notwendig, noch einmal auf die Tatsache zurückzugreifen, daß tatsächlich in der Hauptsache nur legereife Weibchen als Auswanderer auftreten. Faßt man Tiere, die gerade erst in der Tiefe des Schleimhauttrichters sichtbar werden, so macht man durchweg die Beobachtung, daß sie nicht gerade legen, sondern daß die ersten Eier erst nach Verlauf einer, freilich recht kurzen Zeit, wenigstens aber nach $^1/_2$—$^3/_4$ Min., aus der Vulva austreten. Das scheint in der Tat zu beweisen, daß erst der Sauerstoff in der Lage ist, die Uteruskontraktion herbeizuführen. Dem ist aber sicherlich nicht so!

Zunächst sprechen theoretische Ueberlegungen dagegen. Uteruskontraktionen sind nämlich nicht nur zur Eiablage notwendig, sondern auch zu einer viel früheren Zeit, wenn auch die Mehrzahl der Würmer sich noch in höheren Darmabschnitten aufhält, — dann nämlich, wenn die von den Ovarien produzierten Eier in den außerordentlich langen und gewundenen Geburtswegen, die das Mehrfache einer Wurmlänge ausmachen, gleichmäßig verteilt werden müssen. Schließlich aber noch früher — die Uterusbewegungen finden nach Leuckart in beiden Richtungen statt — um den männlichen Samen an die befruchtungsfähigen Stellen zu befördern, da die Spermatozoen der Oxyuren an sich unbeweglich sind.

Um die Frage auch experimentell klären zu können, war es notwendig, Oxyuren zu beobachten, ohne daß sie nennenswert mit Sauerstoff in Berührung gekommen waren. Zu diesem Zwecke habe ich Oxyurenträger ihre Stuhlgänge in abgekochtes, luftfreies Wasser entleeren lassen, und zwar so, daß sie mit ihrem Gesäß, also auch mit ihrer ganzen Analgegend, direkt in diesem Wasser untertauchten. Die erste Kotmasse wurde dann für die Beobachtung ausgeschaltet, da bei ihr die äußere Luft, die vielleicht schon im alleruntersten Teile des Rectums eine gewisse Rolle spielt, das Resultat beeinflussen konnte. Nur die Oxyuren, die aus den nachfolgenden Kotballen unter dem luftfreien Wasser auskrochen, wurden beobachtet. Ich habe diese Tiere bis 8 Std. lang bei Körperwärme in physiologischer Kochsalzlösung lebend und lebhaft beweglich gehalten und beobachtete bei ihnen während dieser Zeit die allerlebhaftesten Kontraktionen der Uteri, was schon makroskopisch durch die im ganzen Körper hin und her wandernden helleren und dunkleren Stellen in Erscheinung trat.

Damit dürfte direkt erwiesen sein, daß die Wehentätigkeit nicht an die Wirkung des Luftsauerstoffes gebunden ist.

Zu einer Eiablage kam es jedoch auch nach stundenlanger Beobachtung bei denjenigen Würmern nicht, deren Geburtswege noch nicht vollständig, sondern nur erst in mäßigem Grade mit Eiern angefüllt waren! — Das aber besagt, daß die Uteruskontraktionen an sich noch nicht genügen eine Eiablage herbeizuführen, sondern daß höchstwahrscheinlich zunächst einmal eine gewisse maximale innere Spannung notwendig ist, um die Widerstände zu überwinden und die Passage für die Eier nach außen freizumachen. Diese kritische Spannung kann nun zwar auch bei nur annähernd vollendeter Ei-

füllung und Eireife im Augenblick der Auswanderung und der damit fast momentan einsetzenden Austrocknung im Verlaufe von ganz wenigen Sekunden erreicht werden; sie kann jedoch auch auf andere Weise herbeigeführt werden, so durch den Druck des Deckgläschens bei mikroskopischer Untersuchung, und es liegt kein Grund vor zu der Annahme, daß sie sich nicht auch — wenn auch etwas langsamer — schon innerhalb des Darmes des Parasitenträgers entwickeln könnte, in Sonderheit dann, wenn es sich um Tiere handelt, die sich noch in verhältnismäßig hohen Darmregionen aufhalten — in der Cöcal-Gegend oder im Bereich der Antiperistaltik des proximalen Colonteiles. Eine ganz minimale, objektiv am Einzelei gar nicht meßbare Längenzunahme der Eier könnte schon in der 3 Potenz (Volumen!) bei einer Multiplikationsziffer von 12000 durchaus genügen, diesen kritischen Druckpunkt zu überschreiten. Doch auch dann, wenn man solche Zunahme nicht mehr für denkbar halten sollte, darf in der Heranreifung und Ausstoßung der letzten Eischübe aus den Ovarien ein durchaus hinreichender Grund dafür gesehen werden.

Es mußte also mit allergrößter Wahrscheinlichkeit damit gerechnet werden, daß die Eiablage tatsächlich auch ohne Hinzutritt von Sauerstoff im Darme selbst stattfindet.

Luftsauerstoff und Eientwicklung.

Nun wäre es aber denkbar gewesen, daß zwar die Eiablage in höheren Darmabschnitten stattfinden kann, daß aber die Entwicklung der Eier an den Zutritt von Luftsauerstoff gebunden ist.

Nach den Leuckartschen Skizzen (Abbildung 14) sind bei den Eiern zu unterscheiden.

1. Eier mit ungeteiltem Dotter und Keimbläschen (a),
2. Solche in Klüftung, d. h. in den ersten Furchungsstadien (b—e);
3. Eier in fortgeschrittener Furchung, nach Fülleborn auch kleinzelliges Morulastadium zu benennen (bei dem man oft genug auch sehr deutlich einen sich bildenden Darm bemerken kann) (f, g).
4. Eier mit deutlich erkennbarem und seitlich an dem ovaloiden Körper hochgeschlagenen, spindeldürren Schwanze; auch erstes Embryonal- oder Kaulquappenstadium genannt (h, i, k).
5. Eier mit einem aus obigem Kaulquappenstadium durch Längsstreckung hervorgehenden, nematodenähnlichen und oft lebhaft beweglichen Embryo, sog. 2. oder nematodenähnliches Embryonalstadium (l, m).

Leuckart vertritt die Auffassung, im Gegensatz zu Vix, daß die Eier der Oxyuren, die den Anus verlassen, bereits einen fertigen Embryo (1. Embryonalstadium) enthalten. Es wäre also nach dem Vorhergehenden gut denkbar, daß die Eier erst embryoniert abgelegt werden, die Embryonen sich nach der Ablage also nicht erst zu entwickeln, sondern nur auszukriechen brauchten. Ich kann nach unzähligen Beobachtungen der Leuckartschen Auffassung nicht zustimmen. Ich muß hierin vollständig Goebel beipflichten, der auch feststellte, daß die ganz frisch augenblicklich beim abendlichen Erscheinen am After untersuchten Oxyuren nicht, oder nur in den seltensten Fällen embryonierte Eier enthalten[1]). Die Eier sind im allgemeinen unreif

1) Ganz vereinzelt sah ich auch Weibchen den Anus verlassen mit Eiern, die noch Keimbläschen enthielten. Der nicht ganz uniforme Eibefund

in dem Sinne, daß sie noch keinen in ihrer Form erkennbaren Embryo enthalten. Freilich kann man sie deswegen keinesfalls als unentwickelt bezeichnen, sie sind im Gegenteil recht weit in ihrer Entwicklung vorgeschritten. Wenn sie auch bei flüchtigem Hinsehen an das glatte Dotterstadium erinnern könnten, so spricht doch 1. das Fehlen des Keimbläschens, 2. das Fehlen von Furchungsstadien, 3. aber das mitunter wenigstens vereinzelt bei einigen Eiern des gleichen Weibchens erkennbare oder wenigstens angedeutete 1. Embryonalstadium

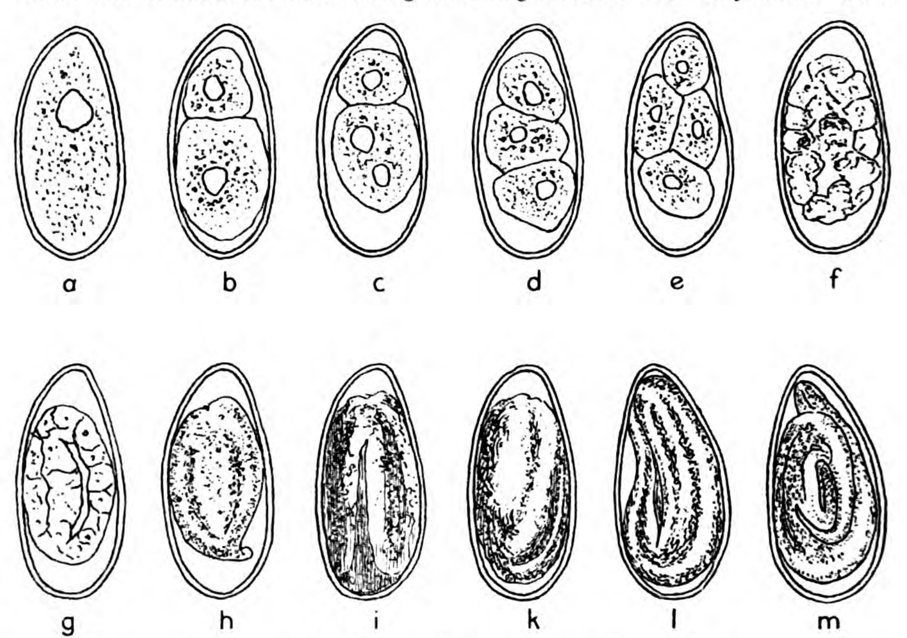


Abb. 14. Eier in verschieden weit fortgeschrittener Entwicklung. a ungeteilter Dotter mit Keimbläschen, b—e Eier in Klüftung, f und g fortgeschrittene Klüftung (kleinzelliges Morulastadium), h beginnende Schwanzbildung, i I. Embryonalstadium von vorn, k I. Embryonalstadium von der Seite, l Embryo in Längsstreckung, m II. Embryonalstadium.

Die Abb. 2—4 sind photographische Wiedergaben von Hellerschen Bildern, entnommen dem Lehrbuch von Schmaus-Herxheimer XI. Aufl.

Abb. 5 und 14 sind Zeichnungen nach Leuckartschen Skizzen aus seinem Werke „Die menschlichen Parasiten und die von ihnen herrührenden Krankheiten". 1876. Bd. 2.

Alle anderen Abbildungen dieser Arbeit sind eigene Originalphotographien.

dafür, daß wir es mit dem kleinzelligen Morulastadium zu tun haben, das ja unmittelbar der Embryonierung vorausgeht. Es ist nun zweifellos richtig, daß die Entwicklung der Embryonen nach der Ablage in der feuchten optimalen „Brutschranktemperatur" der Analgegend

---

in den Weibchen findet unschwer seine Erklärung in Störungen lokaler Natur, die die „normgerechte" Herausbeförderung morulierte Eier enthaltender Weibchen naturgemäß beeinflussen müssen. Noch nicht ganz legereife Tiere, die sich zufällig weiter unten im Darme entwickelten, werden oder müssen also bei ihrem Umherwandern auch einmal mit prämaturen Eiern außerhalb des Afters erscheinen. Die Variationsbreite ist eben verhältnismäßig groß — wodurch zum Teil sich widersprechende Berichte früherer Autoren verständlich werden.

sehr schnell geschieht und schon nach wenigen Stunden sich in den Eiern voll entwickelte wurmähnliche (nematodenähnliche) Embryonen befinden, wobei mithin auch das Kaulquappenstadium in ganz kurzer Zeit erreicht worden sein muß. Es wäre jedoch immerhin vorstellbar, daß die Eier erst während des Umherkriechens der Weibchen im allerletzten, vielleicht lufthaltigen Rektalabschnitte überhaupt ihre Entwicklung mit der Furchung begännen. Das ist jedoch deswegen auszuschließen, weil auch die sich in höheren Dickdarmgegenden aufhaltenden Tiere, die man unmittelbar im Anschluß an die Defäkation durch hohe Einläufe ausspült, nicht nur — selbstverständlich — Weibchen mit in Furchung begriffenen, sondern sehr reichlich auch solche mit morulierten (also schon recht weitentwickelten) Eiern sind. Die Entwicklung muß also unter allen Umständen auch im luftleeren Darme wenigstens eingeleitet werden.

Luftsauerstoff und Embryonierung.

Nun sind die Eier, die man vom Rektalschleim abstreicht, fast durchweg embryoniert, meist im 2. Stadium. Es fragt sich also, ob, wenn auch nicht für die Einleitung der Entwicklung überhaupt, so doch für ihre Vollendung die Sauerstoffeinwirkung obligatorisch ist, oder ob auch die Embryonierung etwaiger, in höheren luftleeren Darmabschnitten abgelegter und dort durch glückliche Umstände haftender Eier möglich erscheint. Gegen die Auffassung, daß erst und nur der Sauerstoff die Embryonierung herbeiführt, spricht nun 1., daß man sich nicht recht vorstellen kann, wie der Sauerstoff überhaupt durch die außerordentlich dicke Chitinhülle der Eier hindurch wirken soll. Das ist auch die Meinung von Prof. V. Haecker und Prof. Alverdes, wie sie anläßlich mündlicher Besprechungen im hallischen Zoologischen Institute geäußert wurde. 2. spricht dagegen die Tatsache, daß ja innerhalb des mütterlichen Oxyurenkörpers die Eier noch weiterhin ziemlich radikal vom Sauerstoff der Luft abgeschlossen sind und trotzdem Weibchen mit kaulquappenembryonen-haltigen Eiern keineswegs selten sind.

3. aber spricht eine Beobachtung dagegen, die einem Zufallsversuche entspricht. Ich entnahm dem Anus abends auskriechende Weibchen, die ich sofort nach Erscheinen in gebräuchlicher 10proz. Formalinlösung (die also 3—4 Proz. reines Formaldehyd enthält!) fixierte. Den sonstigen Erfahrungen entsprechend, mußten diese Tiere Eier im Morulastadium enthalten; sie sollten einige Tage später nach Aufhellung in Glyzerin untersucht werden. Nicht wenig erstaunt aber war ich, als ich schließlich bei der Untersuchung feststellte, daß einzelne Tiere nicht nur verhältnismäßig reichlich Eier mit wurmförmigen, also maximal entwickelten Embryonen enthielten, sondern auch diese Embryonen, nachdem die Würmer 8 Std. in obiger Formalinlösung und danach wenigstens noch 36 Std. in Glyzerin gelegen hatten, zum Teil sich noch, wenigstens in der Wärme, in aller lebhaftester Weise bewegten. Das läßt nicht nur eine geradezu sagenhafte Resistenz der Eischalen (Chitinhüllen) erkennen, wodurch wiederum auch die soeben angeführte Unwahrscheinlichkeit der Einwirkung des Sauerstoffs durch Mutterkörper und Eischale hindurch nachdrücklich unterstrichen wird, sondern erweist auch direkt, daß die Weiterentwicklung der Eier ohne Sauerstoffzutritt möglich ist, da die 3—5 Sekunden, die verstrichen

waren, um den Wurm vom After in die Formalinlösung zu transportieren, wohl kaum ernstlich für die Entwicklungsanregung resp. -förderung verantwortlich gemacht werden können[1]). Es muß also wohl oder übel damit gerechnet werden, daß auch die Embryonierung der Eier im Darme selbst ohne Luftzutritt möglich ist.

Die Ausschlüpfung der Embryonen.

Die letzte Frage, ob die Embryonen ohne Andauung durch den Magensaft imstande sind, ihren Chitinpanzer zu sprengen, muß schlechterdings schon als im positiven Sinne entschieden gelten. Schon Vix war es gelungen, Oxyureneier in einer feuchten Kammer bei Körperwärme zur Ausschlüpfung zu bringen, Leuckart gelang es, wenigstens vereinzelt hin und wieder, gleichfalls und zwar vorwiegend dort, wo die Entwicklung der definitiven Embryonalform längere Zeit gedauert hatte und der Deckel der Eischale durch Mazeration gelockert war, was also recht gut den im Darm herrschenden Verhältnissen entsprechen könnte. Heller gelang es, Embryonen in Speichelflüssigkeit zum Ausschlüpfen zu bringen, und um schließlich noch einen neueren Autor beizubringen — Goebel hat Eier im körperwarmen, feuchten Brutschrank aus dem Morulastadium in bewegliche Embryonen übergeführt, die zum großen Teil bereits nach 48 Std. ihre Eihüllen durchbrochen hatten und ausgeschlüpft waren. Goebel hat seine Versuche auch mit Dünndarminhalt und Dickdarmstuhlwasser (Aufschwemmung von Dickdarminhalt in physiologischer Kochsalzlösung) wiederholt und auch in diesen Medien eine Ausschlüpfung der Embryonen herbeigeführt — es gelang ihm sogar, die jungen Larven einige Stunden am Leben zu erhalten. Er hält daher eine Aufzucht der Oxyuren im Darme selbst für wahrscheinlich und vermutet, ähnlich wie Still, besonders in der Appendix und im Coecum ihre physiologische Brutstätte.

Der Appendixinhalt soll nun freilich nach Nora Wundt weder ein geeignetes Medium für die Entwicklung der Eier noch für die Ausschlüpfung der Embryonen sein. Ich selbst muß nach dem Ergebnis einer parallelgehenden Arbeit jedenfalls durchaus ablehnen, etwa in der Appendix „die" Brutstätte der Oxyuren zu sehen, wie sich aus Massenuntersuchungen Appendektomierter, mehrere Jahre nach überstandener Operation, zweifelsfrei ergeben hat (vgl. die Arbeit: v. Drigalski und E. W. Koch: Die Bedeutung des Wurmfortsatzes für die Entwicklung der Oxyuren; D. M. W. 1925).

Für die Goebelsche Auffassung der intraintestinalen Entwicklung spricht seines Erachtens auch der von ihm erhobene Befund von leeren Eischalen im Rectum, die an der typischen Deckelstelle eine Oeffnung trugen und die natürlicherweise vermuten ließen, daß der Embryo an dieser Stelle ausgeschlüpft sein mußte. Ferner die Mitteilung Trumpps, der eine ausgeschlüpfte Larve auf der Rektalschleimhaut gefunden hat, sowie mündliche Mitteilungen Ibrahims, der gleichfalls angab, solche bemerkt zu haben. Ich selbst bin in der Lage, diese Beobachtungen durch die Mitteilung zu erhärten, daß

1) Zu bemerken ist noch, daß es an den Untersuchungstagen außergewöhnlich heiß war, daß also wenigstens in dieser Beziehung günstige Entwicklungsbedingungen gegeben waren.

ich im Laufe meiner Versuche mindestens 5mal junge Larven im Rektalausstrich gefunden habe, die etwa das 2—3fache der Eilänge, also ungefähr 0,15 mm groß waren und demnach gerade ausgeschlüpft sein konnten. — Ganz besondere Ueberzeugungskraft aber spricht Goebel einer Mitteilung Rodenwaldts und Röckemanns zu, die in 11tägiger Beobachtung im Stuhl einer an Durchfällen behandelten 21jährigen Patientin in zahlreicher Menge lebhaft bewegliche Oxyurenlarven fanden (wohl etwas ältere als die oben beschriebenen). Reife Weibchen gingen erst später — „nach Wurmkuren" ab. Die Autoren schließen, daß die Entwicklung im Darm stattgefunden haben muß, ohne orale (Re-) Infektion.

Wenn Goebel nun auch die Möglichkeit des Auskriechens durch seine Versuche hinreichend sicher gestellt hat, so ist er sich doch durchaus darüber klar, daß ein vollgültiger Beweis dafür, daß nun auch tatsächlich Embryonen, ohne den Magen passiert zu haben, im Darm die Eier verlassen und neben den Muttertieren an Ort und Stelle aufwachsen, nicht erbracht ist.

Er hat versucht, die Frage definitiv zu klären, indem er sich selbst Oxyureneier per klysma einverleibte. Der Versuch führte zu keinem Resultat, was freilich nach ihm nichts zu besagen hätte, da ja die Eier mit dem nachfolgenden Kote gleich wieder ausgepreßt sein konnten, die Oxyurenweibchen aber ihre Eier an mehr oder weniger geschützten Stellen ablegen könnten. Der Versuch hatte aber m. E. auch noch aus einem anderen Grunde recht ungünstige Aussichten. Dieser liegt wieder in der Anatomie dieser Oxyurenlarven, wie ich bei meinen eigenen 5 Fällen soeben ausgekrochener (oder ausgequetschter) Larven beobachten konnte, und diese Beobachtungen decken sich vollkommen mit einer Mitteilung Leuckarts, der in einem Falle eine Larve, die schon auf die 10fache Länge eines eben ausgekrochenen Embryos, also von 0,15 auf 1,5 mm, angewachsen war und sich nach ihm unmittelbar vor der 1. Häutung befand, beschreibt. Diese Larven haben nämlich überhaupt noch keinen akzessorischen Lippenwulst, und auch der Pharyngealbulbus ist bestenfalls gerade angedeutet (vgl. Abb. 5). Von einer Ansaugmöglichkeit kann also bei ihnen gar keine Rede sein. Die jungen Oxyuren, die nun bei oraler Infektion in den hochgelegenen Darmabschnitten zur Ausschlüpfung kommen, haben Zeit heranzuwachsen, und kommen schließlich doch mit fertig ausgebildetem Ansaugmechanismus an ihrem normalen Aufenthaltsorte, dem oberen Dickdarm, an, müssen aber bei einem Auskriechen im unteren Dickdarm für gewöhnlich ohne weiteres mit dem Kot zusammen herausbefördert werden, ohne sich an der Darmwand fixieren zu können und ohne eine Größe erlangt zu haben, die nicht mit einiger Wahrscheinlichkeit dem untersuchenden Auge entgehen müßte.

Bei ganz beschleunigter Darmperistaltik, bei Durchfällen also, fehlt aber auch den jungen Larven, die hoch oben im Darm ausgekrochen sind, die genügende Zeit, sich zu entwickeln, und sie werden mitentleert, ohne die Möglichkeit zu haben, sich zu fixieren. Daß die reifen Weibchen in dem oben zitierten Falle erst später abgehen (propter oder post. Wurmkuren?), ist gleichfalls verständlich, da sie ja bishin zur Legereife im vollen Besitz ihrer Fixationsmöglichkeiten waren und durch den Durchfall nicht wesentlich alteriert wurden. So spricht auch

die Mitteilung von Rodenwaldt u. Röckemann für meine mechanisch begründete Auffassung der „Wanderung" der Oxyuren — ganz abgesehen davon, ob man nun in ihr einen Beweis der direkten Aufzucht im Darm sehen will (was allerdings bei der von den Autoren berichteten Massenhaftigkeit der abgehenden Larven durchaus angehen dürfte).

Ich beziehe mit Absicht die Befunde über Oxyuren und Oxyureneier in der Appendix nicht in meine Betrachtung ein. Die außerordentlich zahlreichen Angaben sind mitunter einander widersprechend, und eine allgemein anerkannte Deutung war bisher nicht zu erreichen. Das mag zum großen Teil damit zusammenhängen, daß die Beobachter durchweg Aerzte sind, für die also in den meisten Fällen die Physiologie der Oxyuren weniger bekannt, und darum auch ihre Mitteilungen über den Reifezustand der Eier, über deren Beurteilung nach meinen Erfahrungen selbst die Ansichten von Fachzoologen in Einzelfällen auseinandergehen können, immerhin etwas skeptisch anzusehen sind. Zweitens ist der Einwand kaum immer mit Sicherheit abzuweisen, daß bei Appendektomien die Ablage der Eier erst unter dem Drucke der bei der Operation auf die Appendix und damit auf event. darin befindliche Weibchen ausgeübt wurde — also unter durchaus unphysiologischen Verhältnissen — erfolgte. Schließlich aber sind nicht immer Mitteilungen vorhanden, ob die Untersuchung wirklich an ganz frischem Material vorgenommen wurde, oder ob man vielleicht die herkömmliche Fixierung mit Formalin einschaltete — wir haben oben an meinem Zufallsbefunde gesehen, daß wir in keiner Weise berechtigt sind, die Embryonenbefunde, die wir dann erheben, mit den wirklich im Darme vorhandenen Verhältnissen ohne weiteres zu identifizieren.

Goebel hat sich am Schluß seiner Arbeit dahin ausgesprochen, daß ein sicherer Beweis für eine Oxyurenfortpflanzung im Darm erst dann erbracht sei, wenn es gelänge, eine Infektion unter Umgehung der Magenpassage herbeizuführen. Ueber die Richtigkeit und allgemeine Verbindlichkeit dieser These dürften keine Meinungsverschiedenheiten bestehen. Mein Hauptziel mußte also sein, eine solche Infektion irgendwie zu erzwingen, oder aber unbedingt beweiskräftiges Material für ihre Unmöglichkeit herbeizuschaffen.

Hauptversuch.

Als Versuchspersonen waren von vornherein Erwachsene ungeeignet, solange die Möglichkeit, daß sich beim Erwachsenen der Zustand einer gewissen „Immunität" irgendwie entwickelt haben könnte, nicht sicher auszuschließen war. Für eine solche Immunität könnte nämlich die Tatsache sprechen, daß alle Menschen, die ja fast durchweg zu irgendwelchen Zeiten einmal Oxyurenträger waren[1]), ihre Parasiten endlich doch einmal — meist dann sogar ohne hinreichende Behandlung — verlieren. Die Versuche wurden daher an Kindern

1) Nach demnächst zur Veröffentlichung gelangenden Untersuchungen Japhas wurden 1922 in Halle bei 66 Proz. aller Volks- und Mittelschüler Oxyureneier gefunden (M. M. W. 1925). Nach eigenen Untersuchungen (vgl. unsere oben zitierte Arbeit) wurden auch Ende 1924 ziemlich genau $^{2}/_{3}$ der Schüler dieser Schulgattungen als Wurmträger festgestellt.

unternommen, bei denen erfahrungsgemäß die Entwicklung einer eventuellen Immunität keinesfalls erwartet werden konnte[1]).

Der Plan meiner Versuche war nun der, unter strenger Ausschaltung jeder Sauerstoffeinwirkung (um allen Einwänden zu begegnen!) ganze Oxyurenweibchen in den Darm bisher sicher oxyurenfreier Kinder zu verpflanzen und nun zu beobachten, ob bei radikaler Asepsis, also sicherer Vermeidung jeder Autoreinfektion, auf die Transplantation eine Infektion im Sinne einer Oxyurenansiedelung und -vermehrung folgte oder nicht.

Als Kontrolle zu diesem Versuche mußte logischerweise im letzteren Falle ein hartnäckig verwurmtes Kind bei radikaler Asepsis ohne jede medikamentöse oder sonstige Behandlung von seinen Würmern frei werden, im ersteren Falle aber mußte die Verwurmung annähernd unverändert fortbestehen.

Es muß nun sogleich darauf hingewiesen werden, daß die Wahrscheinlichkeit, die lebenden Weibchen sehr hoch in den Darm hineinzubringen, außerordentlich gering ist. Damit aber waren die Versuchsaussichten nur wenig günstiger als bei dem Versuche Goebels, denn auch in meinem Falle mußten etwaige im unteren Colon auskriechende Larven aus oben dargelegten Gründen sofort wieder mit dem Stuhle abgehen.

Es kam also alles darauf an, daß es wenigstens in einem Falle zu einem, wenn auch nur ganz bescheidenen Haften und Wuchern der Parasiten kam. Dieser Erfolg erschien nach den bisherigen Beobachtungen im Gesundheitsamt (und nach der landläufigen Meinung) ausgeschlossen. Der Versuch mußte also durchaus als harmlos betrachtet werden.

Ein negativer Ausfall, ein Nichtgelingen der Infektion konnte aber nur dann Beweiskraft haben, wenn bei einwandfreier Asepsis der Kontrollversuch restlos seine Würmer verlor. War das nicht der Fall, so konnte auch mein Versuch, wie der Goebels, keine Klärung der Frage bringen.

Ich benutzte als Wurmspender einen 13 Jahre alten Knaben X, der mir von seinen Eltern wegen außerordentlich starker Oxyuriasis übergeben wurde, und der auch nach wiederholten Kuren im Laufe der letzten Jahre seine Oxyuren nicht los geworden war. Bei Vornahme des Versuches war er ziemlich stark verwurmt, so daß jeder Stuhlgang, wenn auch nicht gerade massenhaft, so doch reichlich mit Oxyuren versehen war. Die Ueberpflanzung wurde versucht an 2 Kindern, einem Mädchen Y von 8 und einem Knaben Z von 4 Jahren, die nach vorhergehender, wochenlanger Beobachtung des Stuhles frei von Oxyuren waren und deren täglich abgenommene Analabstriche (Analschabsel mit Japhaschem Glasspatel) stets auch mikroskopisch frei von Wurmeiern befunden wurden. Um jede Sauerstoffeinwirkung auf alle Fälle auszuscheiden, wurde folgendes Verfahren eingeschlagen: Dem Wurmspender X wurde — nach soeben stattgehabtem Stuhlgange — unter Wasser (Badewanne) ein Einlauf von 1 l körper-

1) Anm. bei Durchsicht der Korrektur:
Nach unseren inzwischen abgeschlossenen Untersuchungen (vgl. l. c.) muß mit aller Sicherheit bei ganz bestimmten Menschen mit einer Disposition für Oxyuriasis gerechnet werden. Die Entwicklung einer „Immunität" dagegen ist höchst unwahrscheinlich.

warmer, physiologischer und unmittelbar vor dem Versuche zur Austreibung der Luft abgekochter Kochsalzlösung einverleibt. Dieser Einlauf wurde gleich darauf wieder entleert in einen großen Trichter, der gleichfalls mit derselben luftfreien Kochsalzlösung gefüllt war, und zwar so, daß auch bei der Entleerung der Oxyurenträger X vollständig in die Flüssigkeit eintauchte, also Sauerstoffzutritt nicht statthatte. In dem Trichter mit dem wiederentleerten Einlauf sanken nun die Oxyuren sehr bald nach unten, die obere Flüssigkeit konnte abgegossen werden, und der Rest wurde unmittelbar zur Ueberführung benutzt. Das Kind Y war vorher mit einem Reinigungseinlauf versehen worden (abgekochtes luftfreies Wasser) und wurde nach dessen Entleerung gleichfalls unter Wasser gesetzt. In dieser Situation wurde nun der oxyurenhaltige Flüssigkeitsrest mit hohem Einlauf per klysma eingeführt und das Miteindringen von Luft durchaus verhindert. Ich habe besonderen Wert darauf gelegt, diese Flüssigkeitsmenge denkbar klein zu bemessen, um das Halten des Einlaufes möglichst lange zu garantieren. Das gelang auch überaus gut, und die nächste Entleerung trat erst am danach folgenden Morgen ein. — In gleicher Weise wurde einige Tage danach der Knabe Z vom gleichen Spender mit Oxyuren versehen.

Es konnte sich von vornherein nur darum handeln, zu versuchen, möglichst große Mengen von Oxyuren überzuführen, da ja ohnehin die Aussicht, die Tiere hoch genug in den Darm hinaufzubringen, äußerst gering, die Wahrscheinlichkeit aber groß war, daß mit den nächsten Stuhlgängen der allergrößte Teil, vielleicht alle Tiere wieder entleert werden würden. Das letztere wurde durch die Versuchsanordnung vollständig vermieden! Obwohl ich bei dem Mädchen X schätzungsweise wenigstens 80—100, bei dem Knaben aber immerhin 20—30 Oxyurenweibchen überpflanzte, waren bei beiden die ersten auf die Transplantation folgenden Stuhlgänge (am folgenden Tage) makroskopisch vollständig frei. Die Tiere gingen erst in den nächsten Tagen, im ganzen 8 Tage lang, allmählich mit den einzelnen Stuhlgängen wieder ab, und zwar waren die abgehenden Tiere beweglich, womit zunächst sichergestellt war, daß der Versuch bis hierher gelungen und tatsächlich, was ja zunächst durchaus nicht sicher zu sein brauchte, lebende Oxyuren in den neuen Wirt überführt worden waren.

Ganz ähnlich verhielt sich der Wurmspender. Dieser war zunächst makroskopisch in beiden Fällen während der nächsten, auf die Entnahme folgenden Tage frei von Oxyuren, und erst darauf traten die Tiere wieder im Stuhlgang auf.

Das Kardinalproblem war nun, Wege zu finden, um eine absolute „Asepsis“ bei allen 3 Kindern sicherzustellen. Konnte diese nicht garantiert werden, so verloren die Versuche durchaus ihren Sinn, das war von vornherein klar. Andererseits waren die Reinfektionsmöglichkeiten außerordentlich groß und nur schwer zu umgehen. Ich entschloß mich zu folgender, sich dann durchaus bewährender Anordnung: Die Kinder bekamen zunächst auf den nackten Körper ein waschbares Leibchen mit kräftigem Trikothöschen, und über diese Kleidungsstücke und sie vollständig bedeckend einen Hemdhosenpanzer aus dichtem Leinenstoff. Derselbe war nur über der einen Schulter zu öffnen, ärmellos, aber mit verhältnismäßig engen Armlöchern, die Hosenbeine aber gingen bis unter die Knie und hatten dortselbst ein so fest schließendes Bündchen, daß die Möglichkeit, die Finger oder gar die Hand durch-

zuführen, nicht bestand. Sonst war das Kleidungsstück vollständig geschlossen und ohne jede Oeffnung. Es konnte nur durch den einen Schulterschluß hindurch an- und ausgezogen werden. Der Schulterschluß aber war nicht von den Kindern selbst öffenbar, sondern regelrecht durch ein kleines Vorhängeschloß gesichert, zu dem der Schlüssel von uns verwahrt wurde. Ein weiteres Schloß war zum Ueberfluß außerdem noch an einem angenähten Gürtel befestigt, der in der Taillengegend noch einmal einen sicheren Anschluß des Anzuges herbeiführte. Diese Doppelkleidung wurde 2 Monate lang Tag und Nacht getragen[1]). Zu jedem Stuhlgang und zu jedem Urinlassen mußten sich die Kinder an uns wenden. Auch während der Defäkation waren sie unter dauernder Kontrolle und mußten die Hände falten, um jede Berührung der Analsphäre zu vermeiden. Die folgende Reinigung, Händewaschen usw. geschah gleichfalls durch uns. Der Anzug wurde nach Bedarf gewechselt und gewaschen, die Unterkleider täglich ausgekocht. Sowohl Aufsicht wie Kinder gewöhnten sich sehr rasch an die strikte Durchführung dieser Lebensweise, so daß ich durchaus dafür einstehen kann, daß die Asepsis unter allen Umständen gewahrt wurde.

Selbstverständlich bestand die Möglichkeit, daß die Kinder sich in der Aftergegend jucken konnten; das konnte aber nur durch die doppelte Kleidung hindurch geschehen, was eine Reinfektion praktisch wohl in jeder Beziehung ausschließen dürfte. (Keineswegs ist diese Sicherheit etwa bei den gelegentlich empfohlenen Nachthandschuhen gegeben, die ja beschmutzt ebenso gut zum Munde geführt werden können wie die unbekleideten Hände.) Schließlich sei noch hervorgehoben, daß Oxyurenspender und infizierte Kinder natürlich auf getrennten Abteilungen gehalten wurden.

Verlauf des Versuches.

Wie schon bemerkt, wurden von den beiden infizierten Kindern zunächst vom 2. Tage an 8 Tage lang lebende Würmer mit dem Kote entleert, dann waren 17 Tage lang makroskopisch keine Oxyuren mehr festzustellen, und auch die tagtäglich von mir angefertigten Analabstriche waren stets frei von Oxyureneiern. An diesem Zustande änderte sich auch in 8wöchiger Beobachtung beim Kinde Z, dem nur 20—30 Tiere transplantiert waren, nichts, so daß in diesem Falle keine Infektion stattfand.

Anders der Fall Y: **Am 26. 7. 1924, am 28. Tage des Versuches, nachdem also 17 Tage lang keine Parasiten mehr abgegangen waren, wurde auf dem Kote ein bewegliches Oxyurenweibchen bemerkt, und unabhängig hiervon wurden von mir selbst am darauffolgenden Tage eine große Zahl embryonierte Oxyureneier im Analabstrich zweifelsfrei festgestellt.** In der Folgezeit blieb dann auch die Y makroskopisch und mikroskopisch von Oxyuren frei.

Damit ist zum ersten Male die experimentelle Infektion eines Menschen unter Umgehung der Magenpassage gelungen und die Entwicklungs- und Vermehrungsmöglichkeit der Oxyuren im Darme selbst erwiesen.

1) Durch doppelte Garnituren wurde für Reinlichkeit in jeder Beziehung gesorgt.

Diskussion des Versuches.

Bei einem genauestens beobachtenden Selbstversuche Leuckarts, der mit einigen seiner Schüler zusammen je mehrere Dutzend Oxyureneier verschluckte, hatte sich ergeben, daß die ersten Tiere am Ende der 2. Woche den Darm verließen, und auch in den folgenden Tagen zusammen bis in den Anfang der 4. Woche hinein einzelne Oxyuren abgingen. Solche Selbstversuche sind inzwischen mehrfach mit ganz gleichem Resultat wiederholt worden — zuletzt wohl von W. Th. Schmidt (M. M. W. 1923. Nr. 16), so daß die Lebensdauer der Oxyuren (nicht der Eier) wohl mit aller Sicherheit auf etwa 2—3 Wochen anzugeben ist[1]).

Selbst die **allerjüngsten** der von mir transplantierten Tiere mußten also in einer noch etwas kürzeren Zeit den neuen Wirt verlassen, da ja bei ihnen wenigstens noch die Zeit, die bis zum Auskriechen der Embryonen aus den Eiern vergeht, abzuziehen wäre. Das erneute Auftreten von Oxyuren trat aber bei meinem Versuche im Gegenteil etwas später auf, am 28. Tage, also am Ende der 4. Woche. Es ist also durchaus abzulehnen, daß dieses Weibchen etwa noch aus dem Einlauf herausstammen könnte.

Es kommt hinzu, daß es schlechterdings nicht vorstellbar ist, daß bei einer Entnahme von Oxyuren aus einer einzigen zusammenhängenden Darmgegend, wie es bei dem Oxyurenspender ja geschah, wo Tiere mehrerer unmittelbar aufeinander folgender Größen entnommen wurden, so daß im neuen Wirt 8 Tage lang eine ganz kontinuierliche Oxyuriasis hervorgerufen wurde (es gingen eben immer nur die gerade fixationsunfähig gewordenen legereifen Weibchen ab), mit einem Male alle Größen über 17 Tage hinweg übersprungen und erst einige im Alter dann folgende Tiere mit hätten entleert und überführt werden können.

Schließlich wäre es freilich vorstellbar, daß außer jenen Tieren, die im Laufe der ersten 8 Tage ja auch den Darm des ursprünglichen Wirtes verlassen hätten, einige abgelegte Eier aus diesen Gegenden mitüberpflanzt wären, von denen man ja annehmen könnte, daß deren Ausschlüpfungszeit im Darm etwas größer sei als diejenige der durch die Magenpassage befreiten Embryonen.

Aber selbst dann müßte ja mein Versuch unter allen Umständen als positiv angesprochen werden; er wäre dann freilich nichts anderes als ein gelungener Wiederholungsversuch Goebelscher Anordnung, wobei ich freilich nicht einzusehen vermag, inwiefern bei meinem Versuche die Aussichten für die überpflanzten **Eier** günstigere gewesen sein sollten als bei Goebel selbst. Wenn man also den freilich wohl unvermeidlichen Einwand „Loch in der Asepsis" nicht glaubt machen zu sollen, den ich übrigens bei der Diskussion des Kontrollversuches noch einigermaßen hoffe entkräften zu können, so wird man sich den Vorgang wohl wie folgt erklären müssen:

So wie es der Norm zu entsprechen scheint, werden wohl ein Teil der überpflanzten Tiere nach ihrer vollen Heranreifung und nach einigem Umherwandern Eier im Darme des neuen Wirtes abgelegt

1) Die Angabe Heubners, daß er bei sich einige Male in 6—7wöchentlichen Abständen ein starkes Ausschwärmen beobachtet habe, ist vielleicht so zu erklären, daß bei ihm weniger zahlreiche Zwischengenerationen der Beobachtung entgingen.

haben. Diese sind, wie es immer bei allen tief unten im Darmtraktus abgelegten Eiern der Fall ist, sehr bald wieder mit dem Kote hinaus befördert, und dem gleichen Schicksal sind auch die Larven verfallen, die vielleicht in diesen Gegenden aus den embryonierten Eiern hervorkrochen, weil sie noch nicht über ausreichende Fixationswerkzeuge verfügten. Nur ganz vereinzelten (vielleicht nur einem einzigen und sicherlich noch verhältnismäßig jungen) Weibchen aber ist es bei seinem planlosen Umherkriechen gelungen, in etwas höhere Dickdarmteile zu gelangen, vielleicht auch unter Mitwirkung der Antiperistaltik des proximalen Colonteiles bis an die etwas Schutz gewährende Bauhinische Klappe. Sie haben, oder es hat dort Eier abgelegt, vielleicht überhaupt nur wenige, und von den Embryonen dieser Eier ist es nun einigen durch glückliche Umstände gelungen, bis zur Ausbildung ihres Saug- und Lippenapparates an den geschützten Stellen der sofortigen Herausbeförderung zu entgehen. Ganz vereinzelte sind also bis zur Geschlechtsreife und Befruchtung herangewachsen und haben schließlich vor ihrer Herausbeförderung wiederum — zum mindesten einige — Eier im Wirtsdarme abgelegt. Die tatsächliche Beobachtung eines Weibchens im Stuhl besagt ja sicherlich, daß wenigstens einige Tiere vorhanden gewesen sind, denn die wirkliche solitäre Existenz eines einzigen Weibchens wäre naturgemäß höchst wahrscheinlich der makroskopischen Beobachtung entgangen. Außerdem muß ja unter allen Umständen noch wenigstens ein Männchen vorhanden gewesen sein. Die Wahrscheinlichkeit ist aber äußerst gering, daß gerade ein Weibchen und ein Männchen sich zur gegenseitigen Befruchtung gefunden hätten. So ist also aus der tatsächlichen Beobachtung des einen legereifen Weibchens mit zwingender Notwendigkeit auf eine gewisse, wenn auch gerade nicht sehr große Vielheit von Oxyuren zu schließen.

Daß das Ergebnis des Versuches keine massivere Infektion sein konnte, war von vornherein zu erwarten. Ich bin mir vielmehr durchaus darüber klar, daß ich mit dem Positivwerden des Versuches noch außerordentliches Glück gehabt habe. An eine Wiederholung wäre schon wegen der außerordentlichen Schwierigkeiten gar nicht zu denken gewesen!

Das Ergebnis muß also voll ausgewertet werden und seine restlose Anerkennung beanspruchen.

Dies kann um so unbedenklicher geschehen, als der Verlauf des Kontrollversuches das Ergebnis des Hauptversuches vollauf bestätigt und in denkbar nachdrücklicher Weise unterstreicht.

Das Kontrollkind, der Wurmspender X, war nach den oben berichteten zweimaligen Einläufen unter genau dieselben aseptischen Kautelen gesetzt worden, wie die Kinder Y und Z. Ich muß hervorheben, daß ich begreiflicherweise die ganzen Versuche, die ich wegen der großen Zeitdauer, die sie beanspruchen mußten, bereits zu Beginn meiner Untersuchungen einleitete, in der festen Ueberzeugung unternahm, daß keine Vermehrung der Oxyuren im Darm stattfände, daß dementsprechend auch keine Infektion eintreten würde. Sollte also dann das negative Ergebnis dieses Infektionsversuches überhaupt etwas besagen, so mußte es gesichert sein durch das vollständige Freiwerden des Wurmspenders von seinen Parasiten ohne jedwedes

Wurmmittel, lediglich durch Asepsis. Ich mußte also, um überhaupt schließlich etwas berichten zu können, mit geradezu übertriebener Pedanterie auf die Durchführung der Asepsis dringen! Da dieselbe sich in ganz gleichem Maße auf die Kinder Y und Z erstreckte, dürfte die Vermutung, daß das Positivwerden des Kindes Y durch einen Fehler der Asepsis entstanden sei, wohl auszuschließen sein. Ganz besondere Ueberzeugungskraft aber bekommt unter diesen Voraussetzungen das Ergebnis des Kontrollversuches X!: Es erfolgte nämlich nicht nur keineswegs eine Befreiung des Oxyurenträgers von seinem Leiden, sondern es trat noch nicht einmal im Laufe der ganzen achtwöchigen Beobachtungszeit ein zahlenmäßiger nennenswerter Rückgang der abgehenden Würmer ein!!! Jedenfalls gelang es mir nach Ablauf der 2 Monate ohne weiteres, mit einem einzigen Einlauf wieder 60 bis 80 Oxyuren auszuspülen, worunter sich allein wenigstens 15 Männchen befanden!

Es ist bei einem solch massigen Befunde natürlich undiskutabel, etwa von einem „gelegentlichen Loch in der Asepsis" zu sprechen! Es besteht nur die Möglichkeit, entweder zu erklären, daß überhaupt keine, auch nicht die allergeringste, Asepsis beobachtet wurde, was nach den geschilderten Maßnahmen doch wirklich nicht angeht, oder aber man muß die einzig denkbare Konsequenz ziehen, zuzugeben, daß alle aseptischen Maßnahmen bei meinen Versuchen auf die Persistenz der Oxyuriasis keine, oder jedenfalls nur eine ganz untergeordnete Wirkung gehabt haben. Dann aber ist die Vermehrung der Oxyuren im Darme selbst, ohne Magenpassage, eine ganz gewöhnliche, der Norm durchaus entsprechende Erscheinung, und die unter gewöhnlichen Verhältnissen dauernd erfolgende Autoreinfektion bedingt nicht, sondern erhöht lediglich die Dauerfähigkeit dieser Parasiten, resp. sorgt für ihre Weiterverbreitung in anderen Wirten.

Dieses nicht nur theoretisch gewonnene, sondern nun auch experimentell gesicherte Ergebnis steht in scharfem Gegensatz zu der landläufigen Auffassung, insonderheit zu derjenigen Leuckarts. Dieser argumentierte, wie folgt: Er wies auf die Tatsache hin, daß die Zahl der im Darm angetroffenen Jugendformen (ausgekrochene Larven) zu der Menge der embryohaltigen Eier in gar keinem Verhältnis stehe. „Und dieser Umstand fällt um so mehr auf, als man keinerlei Grund einsieht, der die Embryonen verhindern könnte, alsbald nach ihrer Entwicklung aus der Eischale hervorzuschlüpfen und ihre Metamorphose ohne Auswanderung zu vollenden — vorausgesetzt natürlich, daß ein solches spontanes Ausschlüpfen überhaupt vorkommt! — Wäre die Auswanderung in der Tat keine notwendige Vorbedingung der späteren Metamorphose, dann müßten sich die Oxyuren in kürzester Zeit unermeßlich vermehren; die Fälle eines spärlichen oder gar solitären Vorkommens, die viel häufiger sind, als man anzunehmen geneigt ist, würden kaum möglich sein."

Es kann allen diesen Argumenten keine ernstliche Beweiskraft mehr zugesprochen werden.

Das Mißverhältnis zwischen der Anzahl der Eier und den ausgekrochenen Larven ist hinreichend dadurch erklärt, daß die Eier, sofern sie nicht an ganz geschützten Stellen und hoch oben im Darme

abgelegt werden, sofort mit den Fäkalmassen den Darm verlassen, ohne genügend Zeit dort verweilt zu haben, daß eine Ausschlüpfung möglich gewesen wäre, wozu nicht nur die hinreichende Entwicklung des Embryos selbst, sondern sicherlich auch eine gewisse Andauung oder Mazeration notwendig oder wenigstens förderlich sein dürfte. 2. ist zu bedenken, daß die eben ausgeschlüpften Larven unendlich oft der mikroskopischen Untersuchung entgehen werden, weil sie viel feinere Gebilde als etwa die doppelt konturierten Eier sind, weil sie fast gänzlich undifferenziert sind und nur zu leicht mit gewissen Restgebilden der Verdauung, insonderheit mit gewissen kurzen Pflanzenfasern, verwechselt werden könnten. 3. ist das Auge der bisherigen Untersucher überhaupt nicht auf diese jungen Larven vorbereitet, da den meisten von ihnen bisher kaum ein Bild von ihnen bekannt, geschweige denn ein Original mit Bewußtsein vorgelegen hat. 4. sind diese zarten Gebilde natürlich schon bei Herstellung der Präparate in leichtester Weise zerstört, was bei den chitingepanzerten Eiern nur durch Anwendung ganz ungewöhnlich starken Druckes möglich ist.

Schließlich aber muß noch nachdrücklich darauf hingewiesen werden, daß das Mißverhältnis zwischen den abgelegten Eiern und den freien Embryonen noch keineswegs so schreiend ist, wie zwischen den zur Ablage gelangenden Eiern (in einem Weibchen 12000 — und 65 Weibchen sah ich in 3 Std. auswandern!!) und den beim Analabstrich nachweisbaren Eiern, die stets nur — relativ — recht vereinzelt gefunden werden. Fand ich doch beispielshalber einmal bei einem Jungen, der wegen gerader evidenter starker Oxyuriasis spontan zur Untersuchung kam, erst im 3. Analabstrich ein einziges Ei. Fast 100 Proz. auch der abgelegten Oxyureneier sowie der etwa eben ausgekrochenen Embryonen gehen eben der sofortigen Herausbeförderung und Vernichtung entgegen, und „die Fälle spärlichen, ja solitären Vorkommens“ werden durchaus verständlich.

Schlußbemerkung.

Mit meinen Versuchen wird auch das Versagen unserer derzeitigen Therapie verständlich, die meist, sofern sie überhaupt nach wissenschaftlichen Gesichtspunkten stattfindet, höchstens auf das Vermeiden der Reinfektion eingestellt ist. Man darf sich ja nicht damit begnügen, festzustellen, daß die Oxyuren nach der Therapie einmal 14 Tage lang makroskopisch verschwanden, und aus der Tatsache, daß die Patienten bei ihrem zyklischen Wiedererscheinen den Arzt vielleicht resigniert nicht wieder aufsuchten, schließen, daß die Therapie geglückt sei. Bei einigermaßen genauer Beobachtung stellt sich meist sehr schnell der Irrtum heraus. Mißerfolge aber werden nur ungern berichtet. Bemerkenswert sind um so mehr einige rühmenswerte Ausnahmen: Trumpp hat Patienten „genug“ gehabt, bei denen trotz sorgfältigster Ausschaltung der Autoinfektion durch Monate hindurch die Oxyuren nicht verschwanden und Heubner gibt an, daß trotz hygienischen Verhalten seinerseits die Infektion bei ihm selbst nicht zum Verlöschen zu bringen war. Ohne nähere Darlegung der angewandten Schutzmaßnahmen wird man ihnen wohl den Einwand nicht ersparen, daß ihre Prophylaxe doch schließlich vielleicht ungenügend gewesen sei. Meine Versuche mit der dabei geübten radikalen Asepsis aber haben erwiesen, daß ihre Therapie zu gar keinem Er-

folge führen konnte, weil sie die notwendigen Lebensbedingungen der Oxyuren gar nicht in Frage stellte.

Die Therapie der Zukunft wird, der gewonnenen Erkenntnis entsprechend, ihre wichtigste Aufgabe in der Vernichtung der jungen Brut im Dünndarm (und oberen Dickdarm) sehen müssen. Sie ist, wie ich auf Grund meiner neuesten therapeutischen Erfahrungen hervorheben möchte, zwar schwierig, aber keineswegs mehr als aussichtslos anzusehen. Ueber die Einzelheiten meiner Therapie muß ich an anderer Stelle berichten. Hier sei nur noch bemerkt, daß es mir gelang, selbst meinen hartnäckigen Wurmspender, auf den die 2monatige Asepsis ohne jeden Einfluß gewesen war, mit einer einmaligen Kur so radikal von seinen Parasiten zu befreien, daß er während achtwöchiger fortlaufender Beobachtung nicht nur makroskopisch, sondern auch mikroskopisch frei von Oxyuren und Oxyureneiern befunden wurde, obwohl auf das Einhalten der Asepsis auch nicht annähernd mehr jene Sorgfalt verwendet worden war, wie bei meinen vorhergehenden Versuchen. Selbst bei Anerkennung der recht weitgehenden, aber durchaus berechtigten Forderung Heubners[1]) — 2monatige Oxyurenfreiheit — muß also in diesem Falle von einer endgültigen Heilung gesprochen werden. Inzwischen sind Dutzende hartnäckige Fälle nach meiner Methode behandelt worden und haben sämtlich zu einer radikalen Heilung geführt, obwohl die Behandlung immer eine ambulante und dementsprechend die Asepsis eine sehr — zweifelhafte — war.

Auch dieser erfreuliche Ausklang meiner Arbeiten zeigte noch einmal eklatant, daß im vorhergehenden Versuche keineswegs die Autoreinfektion für die Unterhaltung des Leidens verantwortlich gemacht werden kann, und dürfte in Verbindung mit der erstmalig gelungenen extrastomalen Infektion die Möglichkeit der direkten Aufzucht und Vermehrung der Oxyuren im Darme selbst — ohne Reinfektion und Magenpassage — in der Tat definitiv sicher stellen.

Zusammenfassung.

Hauptfragestellung.

„Können die Oxyuren ihre Eier im Darme ablegen und findet gegebenenfalls eine Aufzucht der aus diesen Eiern evtl. auskriechenden jungen Brut an Ort und Stelle statt?“

Hauptergebnisse.

1) Die Mehrzahl der „auswandernden“ Oxyuren erscheint in der Tat in den ersten Stunden der Nachtruhe. Dabei ist das Erscheinen von 30—40 Tieren keine Seltenheit; die von mir beobachtete Höchstzahl war 65 Auswanderer in knapp 3 Stunden. — 2) Die „forcierte“ Eiablage setzt in nächster Nähe des Afters infolge der be-

1) Heubner, dessen letzte „Studien über Oxyuriasis“ (s. L.) mir erst nach Abschluß dieser Arbeit zugängig wurden, gibt nach seiner reichen Erfahrung gleichfalls der Ueberzeugung Ausdruck, daß wohl mit einer Entwicklung der O im Darme gerechnet werden müsse.

ginnenden Austrocknung der Würmer sehr rasch ein und ist durchschnittlich abgeschlossen in 15—20 Min. Die ausgelegten „Wurmschläuche“ werden unbeweglich, vertrocknen vollständig und fallen schließlich stark deformiert und fast unkenntlich von der Haut ab (Verschwinden der Oxyuren). — 3) Ein recht großer Prozentsatz der Auswanderer begibt sich zu den weiblichen Genitalien und dringt in dieselben ein (z. B. von 43 Weibchen 16 in nur 2 Std.!). Diese Tiere bleiben länger beweglich und bilden die Veranlassung zu exzessiver onanistischer Betätigung. — 4) Rückwanderungen der auskriechenden Tiere in den Darm hinein finden nicht statt! — 5) Selbst zielbewußte Wanderungen der Oxyuren zum After hinaus sind abzulehnen. Der Daueraufenthalt der noch nicht legereifen Oxyuren im Darm erscheint nur möglich durch den ihnen eigentümlichen Ansaugmechanismus, der repräsentiert wird durch den akzessorischen Lippenwälst und den Pharyngealbulbus. Die angeblichen „Wanderungen“ der legereifen Parasiten zum After hinaus finden vorwiegend passiv statt und sind rein mechanisch begründet (Funktionsunfähigkeit des zusammengepreßten Pharyngealbulbus durch die selbst den Kopfteil der Weibchen anfüllenden Eiermassen). — 6) Durch den Ansaugmechanismus findet auch das auffallende Mißverhältnis zwischen Männchen und Weibchen seine befriedigende Erklärung. Die saugstarken Männchen verbleiben bis zu ihrem Tode in höheren Darmabschnitten. — 7) Die ganz jungen Oxyuren (bis zur 1. Häutung) haben weder einen Lippenwulst noch einen saugstarken Pharyngealbulbus. Nur in hohen Darmabschnitten auskriechende Larven haben also Aussicht, der Vernichtung (durch vorzeitige Herausbeförderung mit den Fäkalmassen) zu entgehen. — 8) Der Sauerstoff der Luft ist weder Bedingung für die Eiablage noch für die Entwicklung und Embryonierung der Eier. — 9) Im Hauptversuch gelang die erstmalige Infektion eines Menschen mit Oxyuren unter Vermeidung der Magenpassage, und zwar durch Einverleibung ganzer Oxyurenweibchen per klysma, bei der trotz radikaler Unterbrechung des Reinfektionsweges ab ano ad os eine Vermehrung im Darme selbst stattfand. Der Kontrollversuch zeigte bei radikaler „Asepsis“ selbst nach 8 Wochen keinerlei Verminderung seiner Oxyuriasis. — 10) In scharfem Gegensatz zu der fast allgemein verbreiteten Leuckartschen Auffassung ist damit die Möglichkeit einer Vermehrung der Oxyuren im Darm selbst — ohne Reinfektion und Magenpassage — definitiv erwiesen.

Literatur.

Ausführliche Literaturangaben von über 200 Arbeiten finden sich bei Goebel.
1) Goebel, Fritz, Die Oxyuriasis. (Ergebn. d. inn. Med. u. Kinderheilk. Bd. 22. 1922.) — 2) Leuckart, Die menschlichen Parasiten und die von ihnen hervorgerufenen Krankheiten. Bd. 2. 1876. — C. Heubner, Studien über Oxyuriasis. (Jahrb. f. Kinderheilk. Bd. 98 .1922. p. 1.) — 4) Brüning, Ergebn. d.

inn. Med. u. Kinderheilk. 1923. Nr. 24. — 5) W. Th. Schmidt, M. M. W. 1923, Nr. 16. — 6) Wundt, M. M. W. 1924. Nr. 17. — 7) v. Drigalski und E. W. Koch, Die Bedeutung des Wurmfortsatzes für die Entwicklung der Oxyuren. D. M. W. 1925. — 8) Japha, Die Verbreitung von Oxyuris vermicularis bei Schulkindern. Münch. med. Woch. 1925. — 9) E. W. Koch, Die Radikalheilung der Oxyuris. D. M. W. 1925 (erscheint demnächst).

Nachsatz. Diese Arbeit wurde ermöglicht durch Mittel der Rockefeller-Stiftung, wofür ich sowohl dem Stifter wie den Herrn Mitgliedern des Hilfsausschusses der Rockefeller-Foundation in Deutschland geziemender Weise meinen herzlichen Dank ausspreche.

E. W. Koch.

Versuche über die Desinfektionswirkung von Rohchloramin-Heyden auf tuberkulöses Sputum.

[Aus dem Hygien. Institut der Universität Greifswald (Stellvertr. Direktor Prof. Dr. Carl Prausnitz).]

Von **Walther Brunk.**

Während die Desinfektion tuberkulösen Sputums bisher in einwandfreier Weise nur durch Kochen oder strömenden Dampf möglich war und selbst durch starke (5prozentige) Sublimatlösung nicht immer ganz sicher erfolgte, ist durch die neueren Untersuchungen, insbesondere von Uhlenhuth und seinen Mitarbeitern, eine Reihe von Präparaten gefunden worden, die eine sichere chemische Sputumdesinfektion ermöglichen (Alkalysol, Parmetol, Chloramin). Bezüglich des Rohchloramins sind aber widersprechende Ergebnisse von Kirstein und Laubenheimer berichtet worden, während Jötten sowie Seligmann und Ditthorn die Uhlenhuthschen Ergebnisse bestätigen. Es erschien mit Rücksicht auf diese Abweichungen in den Versuchsergebnissen verschiedener Laboratorien erwünscht, auch hier eine Nachprüfung vorzunehmen. Es wurden zwei Untersuchungsmethoden verwendet:

a) Methode von Uhlenhuth und Hailer.

4. 9. 1924: Zu je 2 ccm frischem an geballten Massen und Tuberkelbazillen reichem Sputum wurden je 4 ccm 6proz., 4proz. und 2proz. frisch hergestellter Rohchloraminlösung in sterilem destilliertem Wasser in Reagenzgläschen hinzugefügt, die zugeschmolzen, kräftig umgeschüttelt und 4 Std. bei 20° im Dunkeln stehen gelassen wurden. Dann erfolgte die Neutralisation des freien Chlors durch Hinzufügung von bzw. 0,96, 0,64, 0,32 ccm 10proz. Natriumsulfitlösung. Von jedem Gemisch sowie von dem unbehandelten Sputum wurde 0,5 ccm

je 2 Meerschweinchen subkutan injiziert. Die beiden mit 2proz. Rohchloramin-Sputum behandelten und die beiden Kontrolltiere erkrankten an allgemeiner Tuberkulose, die durch Autopsie und Bazillennachweis gesichert wurde. Die mit 4proz. und 6proz. Rohchloramin-Sputum behandelten Tiere wurden am 3. 11. 1924, d. h. nach 2 Monaten, getötet und erwiesen sich als vollkommen gesund.

b) Nach dem C. Prausnitzschen Trockensputumverfahren.

Dasselbe Sputum wurde in dicker Schicht auf sterile Objektträger aufgetragen, im Faust-Heimschen Apparat bei 30—40° getrocknet und einige Tage lang im Exsikkator über Chlorcalcium bei etwa 6° im Dunkeln aufgehoben. Die Objektträger wurden zum Versuch in Petrischalen gelegt, in denen sich bzw. 6, 4, 2proz. Rohchloraminlösung in sterilem destilliertem Wasser befand. Nach 4stündigem Aufenthalt bei 20° im Dunkeln wurden die Objektträger auf 20 Min. in 10proz. Natriumsulfitlösung gelegt und in sterilem destillierten Wasser abgespült. 2 Kontrollobjektträger wurden 4 Std. lang in physiologische Kochhsalzlösung eingelegt; einer von diesen wurde ohne weitere Behandlung, der andere nach 20 Min. langem Aufenthalt in 10proz. Natriumsulfitlösung und Spülung in destilliertem Wasser verwendet. Zur Prüfung auf Lebensfähigkeit der Tuberkelbazillen wurde der Belag abgeschabt und mit 10 ccm sterilem destilliertem Wasser zur homogenen Emulsion verrieben. Mit jedem der desinfizierten Sputumgemische wurden je 2 Meerschweinchen, mit den beiden Kontrollen je 1 Meerschweinchen am 5. 9. 1924 subkutan geimpft. Die beiden mit 2proz. Rohchloramin behandelten und die beiden Kontrolltiere erkrankten an allgemeiner Tuberkulose, die durch Autopsie und Ba-Bazillennachweis gesichert wurde. Die beiden mit 4proz. und die beiden mit 6proz. Rohchloraminsputum behandelten Meerschweinchen wurden am 3. 11. 1924, nach 2 Monaten, getötet und waren vollkommen gesund.

Im Versuch mit flüssigem Sputum hat also das Rohchloramin in etwa 2,7proz., im Versuch mit Trockensputum in 4proz. Konzentration 4 Stunden lang einwirkend eine sichere Abtötung der Tuberkelbazillen bewirkt.

Literatur.

Jötten, Med. Klin. 1923. S. 1397. — 2) Kirstein, Dtsch. med. Woch. 1923. S. 54. — 3) Laubenheimer, Ztschr. f. Hyg. 1923. 100, S. 433. — 4) Prausnitz, C. u. Harris, C. E., Journ. Inst. Publ. Health. 1907/08. — 5) Seligmann u. Ditthorn, Klin. Woch. 1923. S. 2283. — 6) Uhlenhuth u. Hailer, Archiv f. Hyg. 93. 1923. S. 343.

Zur Kenntnis der Keimfreimachung von Gegenständen durch Abbrennen mit Spiritus.

[Aus dem württ. Medizinischen Landesuntersuchungsamt (Vorstand: Ministerialrat Dr. von Scheurlen).]

Von Dr. **Hans Mayser**, stellv. Vorstand des M. L. U. A.

Nach gelegentlichen Beobachtungen ist insbesondere in klinischen Laboratorien das Verfahren der Sterilisierung durch Abbrennen von Spiritus im Gebrauch, über dessen Wirkung ich in der Literatur keine Angaben finden konnte. Da, wie ich gehört habe, auch in einem Entwurf des Reichswehrministeriums betreffend Anleitung zur Vernichtung und Beseitigung der Ansteckungsstoffe dieses Verfahren zur Keimfreimachung von Gegenständen zugelassen sein soll, habe ich es unternommen, dieses Desinfektionsverfahren auf seine Wirksamkeit zu prüfen. Es handelt sich um das Abflammen von metallenen oder porzellanenen Gegenständen nach vorherigem Benetzen mit Spiritus. Man muß dabei 2 Verfahren trennen, nämlich das Eintauchen der Gegenstände in Spiritus und das Eingießen von Spiritus in Gefäße jedesmal mit nachherigem Entzünden. Das 1. ist anwendbar bei Instrumenten, metallenem Eßbesteck usw.; das 2. naturgemäß nur bei hohlen Gegenständen, deren Innenfläche keimfrei gemacht werden soll, wobei wieder zwischen flachen und tiefen Gegenständen, z. B. Teller und Schalen, abgegrenzt werden muß.

Bei meinen zahlreichen Versuchen verwandte ich gute und schlechte Wärmeleiter: 1. Gegenstände aus Metall: eiserne Ampullenfeilen von verschiedener Dicke, Messingdraht. 2. Gegenstände aus Glas und Porzellan: Glasstäbe, Porzellanschalen, Porzellanteller, 3. Gegenstände aus Holz: Zündhölzchen ohne Kopf, Holzschüsseln. Um mit schwer und leicht abtötbaren Keimen zu arbeiten, geschah die Infektion mit Milzbrandsporen und mit Typhusbazillen, die in der einen Versuchsreihe von Agarkulturen mit der Platinöse abgeschabt und auf den betreffenden Gegenstand geschmiert wurden; in anderen Versuchen wurden Bouillonkulturen angetrocknet, damit die Bakterien in möglichst dünner Schicht auf der Oberfläche verteilt waren. Das Abflammen geschah durch Eintauchen der Gegenstände in Spiritus bzw. Eingießen von einigen Eßlöffeln voll Brennspiritus ins Gefäß, Neigen desselben, so daß alle Wände damit benetzt wurden, und Entzünden.

In folgendem führe ich einige Auszüge aus den Versuchsprotokollen an:

I. Sterilisationsversuche durch Eintauchen der Gegenstände in Spiritus und Abbrennen:

Versuch 4. 25. 6. 1924 5 cm langes Stück dicken, frisch ausgeglühten Messingdraht mit 3 Tage alten Agar-Milzbrandbazillenkulturen, die bei mikroskopischer Untersuchung des gefärbten Ausstriches auch Sporen enthalten, mittels Platinöse bestrichen; über Nacht angetrocknet.

26. 6. 1924 mit Spiritus übergossen und sofort entzündet, Brenndauer ca. 5 Sek., Draht in Bouillon geworfen; Brutschrank bei 37°.

27. 6. 1924. Bouillon trübe, dicker Bodensatz, beim Aufschütteln schwimmen weiße Fäden herum; eine Oese auf Agarplatte ausgestrichen; Brutschrank.

28. 6. 1924. Auf der Agarplatte Wachstum von großen, weißen Kolonien, die,

4. 7. 1924. Bouillon klar; Agarplatte beimpft; Brutschrank.

mit der Lupe betrachtet, deutliche Lockenbildung zeigen.

Versuch 6. 29. 6. 1924. Steriler Glasstab mit Milzbrandbazillen und Sporen infiziert wie in Versuch 4; abgeflammt wie bei Versuch 4; Brenndauer ca. 10 Sek.; in Bouillon geworfen; Brutschrank.

30. 6. 1924. Bouillon trüb, Fäden; Agarplatte beimpft; Brutschrank.

1. 7. 1924. Auf Agarplatte Wachstum von lockigen Kolonien.

Versuch 23. 22. 7. 1924. Steriler Glasstab mit 6tägiger Milzbrandbouillonkultur übergossen; getrocknet; mit Spiritus übergossen, angezündet; in Bouillonröhrchen geworfen; Brutschrank.

23. 7. 1924. Bouillon wenig Fäden, Agarplatte beimpft; Brutschrank.

24. 7. 1924. Auf Agarplatte Wachstum von lockigen Kolonien.

Versuch 16. 5. 7. 1924. Sterilen Glasstab mit 24stünd. Typhusbazillenagarkulturabstrich beschmiert, angetrocknet; abgeflammt wie in Versuch 4; in Bouillon geworfen; Brutschrank.

6. 7. 1924. Bouillon trüb; auf Drigalski-Agar abgeimpft; Brutschrank.

7. 7. 1924. Auf Drigalski-Agar Wachstum von runden, durchscheinenden, blauen Kolonien.

Versuch 11. 2. 7. 1924. Zündholz ohne Kopf mit Milzbrandbazillen und Sporen infiziert wie in Versuch 4; abgeflammt wie Versuch 4; als das Holz anfing, braun zu werden, ausgeblasen, Brenndauer ca. 10 Sek.; in Bouillon geworfen; Brutschrank.

13. 7. 1924. In Bouillon Fäden gewachsen; Agarplatte beimpft; Brutschrank.

4. 7. 1924. Wachstum von kleinen, gelblichen, knopfförmigen Kolonien und großen, weißen Kolonien mit Lockenbildung.

II. Sterilisationsversuche durch Eingießen von Spiritus in hohle Gegenstände und Abbrennen:

Versuch 14. 3. 7. 1924. Ausgeglühte Porzellanschale (Durchmesser 12 cm wie sie in chemischen Laboratorien benützt werden) innen mit Milzbrandbazillen und Sporen wie in Versuch 4 beschmiert; angetrocknet; so viel Spiritus hineingegossen, daß die Wände damit durch Neigen benetzt werden konnten; angezündet; Brenndauer ca. 1 Min.; Schale nachher sehr heiß; nach Abkühlen sterile Bouillon hineingeschüttet; mit Deckel zugedeckt; Brutschrank.

4. 7. 1924. Bouillon klar; Agarplatte beimpft; Brutschrank.

5. 7. 1924. Agarplatte steril geblieben; von der Bouillon, die jetzt 48 Std. bebrütet war, auf Agarplatte abgeimpft. Brutschrank.

6. 7. 1924. Agarplatte steril.

Versuch 26. 5. 8. 1924. Steriler Porzellanteller mit 6tägiger Milzbrandbouillonkultur begossen und dieselbe wieder abgeschüttet; im Brutschrank getrocknet: etwa 1 Eßlöffel Spiritus darauf gegossen; angezündet, Brenndauer 1 Min.; Teller warm; sterile Bouillon darauf gegossen; Brutschrank.

6. 8. 1924. Bouillon keine Fäden; 1. Agarplatte beimpft; Brutschrank.

7. 8. 1924. Agarplatte steril; 2. Agarplatte beimpft. Brutschrank.

8. 8. 1924. Beide Agarplatten steril.

Versuch 20. 17. 7. 1924. Steriler flacher Porzellanteller mit 24stündiger Typhusbouillonkultur begossen und wieder abgeschüttet; im Brutschrank getrocknet; abgeflammt wie in Versuch 26; sterile Bouillon darauf gegossen; Brutschrank.

18. 7. 1924. Bouillon klar; Drigalski-Agar damit beimpft; Brutschrank.

19. 7. 1924. Drigalski-Agar steril; Bouillon nochmals auf Drigalski-Agar abgeimpft; Brutschrank.

20. 7. 1924. Drigalski-Agar steril.

Versuch 27. 4. 11. 1924. Holzschüsselchen von ca. 20 cm. Durchmesser durch Auskochen sterilisiert; getrocknet; mit Typhusbouillonkultur infiziert; getrocknet; abgeflammt wie in Versuch 26; sterile Bouillon darauf gegossen; Brutschrank.

5. 11. 1924. Von Bouillon auf Drigalski-Agar abgeimpft; Brutschrank.

6. 11. 1924. Auf Drigalski-Agar durchsichtige blaue Kolonien gewachsen, mit Typhusimmunserum Agglutination.

Zahlreiche ähnliche Versuche hatten dieselben Ergebnisse. Auch wurden bei jeder neuen Versuchsanordnung Kontrollversuche ohne Ab-

flammen angesetzt, bei denen immer reichlich Wachstum festzustellen war. Es fand demnach sowohl beim Auftragen der Bakterien in dicker Schicht, wie beim Uebergießen mit Bouillonkultur und Antrocknen eine Abtötung von Milzbrandsporen und Typhusbazillen auf flachen Gegenständen, ohne Unterschied, ob sie aus guten oder schlechten Wärmeleitern gefertigt sind, durch Benetzen mit Spiritus und Abbrennen desselben nicht statt; bei Gefäßen aus schlechten Wärmeleitern konnte ebenfalls keine Desinfektion festgestellt werden; nur wenn die Gefäße, deren Innenfläche sterilisiert werden sollte, aus mittelguten und guten Wärmeleitern hergestellt waren, genügte das „Abflammen" zur Vernichtung der Keime. Der Unterschied ist dadurch zu erklären, daß flache Gegenstände, wie Instrumente, metallenes Eßbesteck usw. kaum merklich erwärmt werden, da an ihrer Oberfläche nur wenig Spiritus in dünner Schicht verteilt ist. Ebenso verhält es sich mit Gefäßen aus schlechten Wärmeleitern, z. B. Holzschüsseln, bei denen durch Ansammlung des Spiritus auf dem tiefsten Punkt die Brenndauer wohl wesentlich größer ist, die gebildete Hitze aber nicht weitergeleitet wird. Gefäße aus guten Wärmeleitern, z. B. Schalen und Teller aus Metall, auch aus Glas und Porzellan, werden dagegen stark erhitzt, da die Brenndauer genügend groß ist und die Wärme sich dem ganzen Gegenstand rasch mitteilt. Daraus ist zu schließen, daß das Feuer als solches bei dieser Versuchsanordnung kein Desinfektionsmittel ist; die Erhitzung des bakterientragenden Gegenstandes durch die Flamme bewirkt die Abtötung und diese ist je nach dem Herstellungsmaterial und der Form des Gegenstandes verschieden.

Inhalt.

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena — 5296.

Centralbl. f. Bakt. etc. I. Abt. Originale. Bd. 94. Heft 5.

Ausgegeben am 10. März 1925.

Ueber die Gewinnung von Tuberkelbazillenreinkulturen.

[Aus dem Bakteriologischen Institut zu Smolensk (Direktor: M. Isabolinsky).]

Von **M. Isabolinsky** und **W. Gitowitsch.**

Die Frage über die Gewinnung von Tuberkelbazillenreinkulturen erregte schon seit langer Zeit das Interesse vieler Forscher und ist noch jetzt Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Da der Tuberkelbazillus besondere biochemische Eigenschaften besitzt und ganz eigentümliche Beziehungen zum Tierorganismus hat, ist es eine sehr schwere Aufgabe, einen passenden Nährboden für ihn zu finden. Diese Frage zu lösen, ist man schon seit 40 Jahren bemüht.

Zuerst bekam R. Koch noch 1882 das Wachstum von Tuberkelbazillen auf koaguliertem Rinderblutserum 5—6 Tage nach der Beimpfung des Nährbodens. Es gelang auch später einer ganzen Reihe anderer Forscher, Wachstum von Tuberkelbazillen auf verschiedenen Tiersera mit mehr oder weniger günstigem Erfolg zu erzielen. Später wurde von Strauß für das bessere Wachstum von Tuberkelbazillen Glyzerinbouillon und von Nocard und Roux Glyzerinagar vorgeschlagen. Doch erhielt man auf diesen Nährböden nicht immer eine Reinkultur der Tuberkelbazillen. Die Anwendung einer ganzen Reihe von Nährböden, die aus menschlichen und tierischen Organen und Geweben hergestellt waren, gaben auch keine günstigen Resultate; es gelang aber einigen Forschern, insbesondere bei Hinzufügung von Glyzerin, eine Reinkultur von Tuberkelbazillen zu erzielen. Außer tierischen Nährböden ist in der Literatur eine ganze Reihe von Nährböden vegetabilischen Ursprunges, wie Kartoffel, Schnittkohl, gelbe Rüben u. a. erwähnt, die von den Forschern zur Erhaltung einer Erstkultur von Tuberkelbazillen benutzt wurden. Von diesen vegetabilischen Nährböden verdient besondere Aufmerksamkeit der Kartoffelnährboden, der von Pawlowsky zuerst vorgeschlagen wurde. Nach seinen Beobachtungen beginnt das Wachstum von Tuberkelbazillen auf diesem Nährboden vom 12. Tage an und erreicht gegen Ende der 5.—6. Woche die größte Entwicklung, besonders bei saurer Reaktion. Kühne, Proskauer, Beck, Fraenkel, Lockemann, Löwenstein und Pick haben für das Wachstum Nährböden vorgeschlagen, die verschiedene chemische Substanzen pflanzlichen und tierischen Ursprungs enthalten, wie Thyrosin, Leucin, Asparagin, phosphorsaures und schwefelsaures Ammonium und Magnesium. Nach Löwenstein ist der flüssige Nährboden aus Glyzerin und phosphorsaurem Ammonium am günstigsten nicht nur für das Wachstum der Tuberkelbazillen, sondern auch für die Gewinnung von Tuberkulin, das eine typische Reaktion bei tuberkulösen Meerschweinchen hervorruft. Außer den oben erwähnten Nährböden, die angewandt werden hauptsächlich zur Erlangung von Erstkulturen des Tuberkelbazillus, sind besondere elektive Nährböden vorgeschlagen worden, um Tuberkelbazillen aus tuberkulösem Material, hauptsächlich Sputum, zu züchten. Es seien hier der Nährboden nach Hesse (Nährstoff Heyden + Glyzerin + Agar + Sodalösung bei Hinzufügung von Somatose) und der Nährboden nach Ficker (Hirnagar oder Agar mit Hinzufügung von Sputum) erwähnt. Die Resultate aber, die von verschiedenen Autoren mit diesen Nährböden erzielt wurden, sind so widersprechend, daß sie kaum für praktische Zwecke in Frage kommen dürften. Es muß noch ein weiterer elektiver Nährboden, der von Schmidt, Mühlheim und Klein vorgeschlagen ist und aus sterilisierter Milch besteht, erwähnt werden. Nach Beobachtungen von Valletti gedeihen Tuberkelbazillen vom Typus humanus auf Agar bei Hinzufügen von Frauenmilch zu diesem und Tuberkelbazillen vom Typus bovinus bei Hinzufügen von Kuhmilch zum Agar. Das Wachstum beginnt schon $1^1/_2$—2 Tage nach der Beimpfung, wobei man ein üppiges Wachstum von Tuberkelbazillen beobachten kann, was auf anderen Nährböden nicht der Fall ist. Unsere Versuche mit dem oben erwähnten Nährboden gaben keine günstigen Resultate, und nur in einigen Fällen

gelang es uns, eine reine, aber sehr spärliche Kultur von Tuberkelbazillen nach 3—4 Wochen Thermostatenaufenthalt zu erzielen. Um eine Reinkultur von Tuberkelbazillen aus Sputum zu bekommen, ist dieser Nährboden ungeeignet, da alle Versuche, aus Sputum eine Reinkultur zu bekommen, ein negatives Resultat ergaben. Seit dem Jahre 1913 besteht, infolge der Arbeiten von Besredka und anderer Forscher, die auf einem Studium der biochemischen Eigenschaften der Tuberkelbazillen beruhen, eine neue Richtung in der Frage über die künstliche Züchtung der Tuberkelbazillen. Noch im Jahre 1903 schlugen Fischel, Hueppe, Besançon, Sorgo Nährböden aus Hühnereier vor, auf denen ihrer Meinung nach das Wachstum der Tuberkelbazillen sehr erfolgreich vor sich geht. Diese Beobachtungen waren jedoch von anderen Autoren in Zweifel gesetzt und bekamen deshalb keine Verbreitung. Heutzutage kann es als feststehend angesehen werden, daß die Tuberkelbazillen im tierischen Organismus im fertigen Zustande die für ihr Wachstum und ihre Vermehrung nötigen Fettwachslipoidstoffe, Lecithin, Aminosäuren und Phosphate bekommen. Diese Stoffe sind jenes notwendige Nährsubstrat, welches einerseits das Wachstum und die Entwicklung der Tuberkelbazillen und andererseits eine Herabsetzung der intracellulären Prozesse, was die selbständige Synthese des Protoplasmas der Bakterienzelle anbetrifft, hervorruft. Was aber das Wachstum der Tuberkelbazillen auf künstlichen Nährboden anlangt, so kann man hier im Gegenteil eine erhebliche Steigerung der Synthesefähigkeit des Protoplasmas der Bakterienzelle beobachten. Der Eiernährboden unterstützt wesentlich die intrazellulläre Synthese und damit auch das Wachstum der Tuberkelbazillen. Das Hühnerei enthält alle für das Leben der Tuberkelbazillen notwendigen Stoffe, wie Lecithin und Phosphate. Es ist sicher, nachdem uns die biochemischen Prozesse der Tuberkelbazillen im tierischen Organismus bekannt sind, daß jeder künstliche Nährboden, der Hühnerei enthält, Aufmerksamkeit verdient.

In vorliegender Mitteilung erlauben wir uns über unsere Züchtungsversuche der Tuberkelbazillen auf Eiernährböden nach Besredka, Petroff und Zechnowizer zu berichten. Weiterhin möchten wir einen neuen Nährboden mitteilen, der aus Ochsenhodengewebe besteht und nach unseren Beobachtungen sehr einfach, billig und sehr brauchbar für praktische Zwecke ist.

Nährboden nach Besredka.

Zur Bereitung des Nährbodens benutzten wir 4 frische Hühnereier. Die Schale wurde zuerst mit Alkohol, dann mit 3proz. Karbolsäurelösung abgerieben und mittels einer sterilen Pinzette entfernt, hierauf wurde das Eiweiß vom Eidotter mit reinen Händen ganz vorsichtig abgesondert. Dann gossen wir den Eidotter in einen sterilen graduierten Zylinder, zerrieben ihn mit einem sterilen Glasstab und fügten 45 ccm einer 1proz. Sodalösung, zuerst ganz geringe Mengen und nach einigen Sekunden einen ganzen ccm hinzu. Um über die Durchsichtigkeit ein Urteil zu erhalten, saugten wir die Flüssigkeit mit einer Pipette auf und beschauten sie bei durchfallendem Lichte. Nach unseren Beobachtungen muß man, um völlige Durchsichtigkeit der Flüssigkeit zu erzielen, noch 3—4 ccm 1proz. Sodalösung hinzufügen. Zu dieser ganz durchsichtigen Nährboden gießt man 1400 ccm Aqu. dest. hinzu Der Nährboden wird in 50—100 ccm-Kolben gegossen und im Autoklaven bei 110° während 20 Min. sterilisiert. Oft kann man in einige Kolben, trotz der sorgfältigsten Zubereitung, nach einigen Tagen a· der Oberfläche des Nährbodens ganz feine Häutchen (wie Schimmelpilze) und in den unteren Schichten Bröckelbildungen, die bei Schütteln zerkleinert werden, beobachten. Um Mißverständnisse zu vermeiden, gebrauchten wir solche Kolben für Impfungen, trotz ihrer Sterilität, nicht. Später sind wir aber zur Ueberlegung gekommen, daß weder das feine Häutchen, noch die Bröckelbildung im Nährboden einen Einfluß auf das Wachstum der Tuberkelbazillen ausüben. Für die ersten

Versuche benutzten wir je eine alte Kultur vom Typus humanus und bovinus, die im Laboratorium seit 9 Jahren auf Glyzerinagar aufbewahrt wird, im weiteren gebrauchten wir für Impfungen frisch gewonnene Kulturen. Die Kolben mit dem Nährboden wurden reichlich mit Kulturen beider Typen beimpft und in den Thermostat bei 38° gestellt. Einmal wöchentlich wurden aus den beimpften Kolben Ausstrichpräparate aus verschiedenen Schichten des Nährbodens bereitet, nach Ziehl gefärbt und mikroskopisch untersucht. Unsere wiederholten Untersuchungen während der 6wöchigen Periode des Wachstums der Kulturen auf dem Nährboden nach Besredka haben erwiesen, daß kein reichliches Wachstum der Tuberkelbazillen zu erzielen ist. In maximo betrug die Zahl der Tuberkelbazillen im Gesichtsfelde in den Ausstrichpräparaten je 30—50, wobei gar kein Wachstum in Form von langen Zöpfen und Bündeln zu beobachten war. Man konnte auch keinen scharfen Unterschied zwischen den Impfungen aus alten und aus frisch gewonnenen Kulturen beobachten: in beiden Fällen war das mikroskopische Bild ähnlich. Die folgenden Generationen, die durch Ueberimpfungen der 3—4wöchigen Kulturen auf frische Nährböden gewonnen waren, zeigten auch kein reichliches Wachstum von Tuberkelbazillen, im Gegenteil, oft war die Zahl der Bazillen in Ausstrichpräparaten, die aus Kulturen der 2. und 3. Generation hergestellt waren, fast zweimal weniger als in der ersten Generation; die charakteristischen Bildungen in Form von Bündeln und Zöpfen waren gar nicht zu beobachten. Eine zweite Serie von Versuchen war den Impfungen von Sputa, die mehr oder weniger große Mengen von Tuberkelbazillen enthielten, gewidmet. Das Sputum wurde homogenisiert (Alkali und nachfolgende Neutralisation durch Salzsäure), zentrifugiert, der Niederschlag wurde dann reichlich auf die Nährböden nach Besredka geimpft. Alle 4—5 Tage wurden daraus Ausstrichpräparate angefertigt und nach Ziehl oder Much-Weiß gefärbt. Diese Serie von Versuchen, die an einem größeren Material ausgeführt wurde, hat uns gezeigt, daß auch hier kein bedeutendes Wachstum und keine bedeutende Entwicklung der Tuberkelbazillen auf dem genannten Nährboden zu erzielen sind. Bei der Beobachtung der Nährböden während 6—8 Wochen konnten wir uns überzeugen, daß in den ersten Tagen die Zahl der Bazillen gering war trotz der reichlichen Beimpfung und des großen Bazillengehalts des Sputums. Mit der Zeit vergrößerte sich die Zahl der Bazillen bis 30—40—50 im Gesichtsfelde, um sich dann wieder zu vermindern und in einigen Fällen am Ende der 6. und 8. Woche gänzlich zu verschwinden. Gleichzeitig konnten wir in Ausstrichpräparaten, die nach Much-Weiß gefärbt waren, dunkelviolette Körnchen, teils gruppenweise, teils in Form von Ketten zu 6—8 Stäbchen nachweisen. Sehr oft konnte man diese Körnchen in sehr feinen Stäbchen, polartig gelagert, beobachten, ganz ähnlich den Einschlüssen der Diphtheriebazillen bei der Neißer-Färbung. Die Zahl dieser Körnchen vergrößerte sich proportional der Verminderung der Bazillenzahl, so daß gegen Ende unserer Beobachtungen, als die Bazillen fast verschwunden waren, das Gesichtsfeld ausschließlich mit dunkelvioletten Körnchen bedeckt war. Zu dem oben Gesagten müssen wir noch hinzufügen, daß trotz aller Sorgfalt und Vorsicht beim Arbeiten viele von unseren Nährböden durch fremde Mikroorganismen verunreinigt waren, was wesentlich die Verwertung der Resultate hinderte und die Arbeit komplizierte.

Nach unseren Beobachtungen eignet sich der Einährboden nach Besredka nicht für die Gewinnung von Reinkulturen der Tuberkelbazillen in der gleichen Weise, wie wir es bei unserer alltäglichen Laboratoriumsarbeit von anderen anerkannten Elektivnährböden gewohnt sind. Scheinbar können nur akklimatisierte Laboratoriumskulturen auf diesem Nährboden gedeihen, wenn sich in der Bakterienzelle eine gewisse Menge von organischen Verbindungen, die zur Synthese nötig sind und das Wachstum und die Vermehrung der Bazillen im Nährboden verursachen, angehäuft hat. Nicht ganz klar ist für uns die allmähliche Verminderung und das völlige Verschwinden der Tuberkelbazillen nach 6—8 Wochen im Nährboden und die Vermehrung der Körnchen, die bei Färbung nach Much-Weiß nachweisbar sind. Wie bekannt ist, haben noch im Jahre 1910 Deycke und Much und dann eine ganze Reihe von Forschern, wie Sieber und Metalnikoff Zeuner. Williams und Fortyhl, Fissinger und Marie bewiesen, daß unter der Wirkung der alkalischen Lösungen von Lipoidstoffen, wie Lezithin, Neurin, Cholin u. dgl. Bakteriolyse der Tuberkelbazillen zustande kommt, welcher eine Auflösung der Wachshülle vorausgeht. Im weiteren hören sie auf, die Fuchsinfärbung anzunehmen und zerfallen in Körnchen, die voneinander getrennt und eigenartig gruppiert sind und oft an Bazillenreste erinnern. Zeuner ist geneigt anzunehmen, daß diese Körnchen viel Gemeinschaftliches mit Muchs Körnchen haben, läßt aber diese Frage offen, da er keine genügenden Beobachtungen in dieser Richtung besitzt. Es ist möglich, daß im Einährboden nach Besredka, in dem eine erhebliche Menge von 1proz. Sodalösung und von Lipoidstoffen, wie Lecithin, enthalten ist, mit der Zeit eine Bakteriolyse der Tuberkelbazillen, Körnchenbildung und allmähliches Verschwinden der Bazillen zustande kommt. Sieber und Metalnikoff nehmen an, daß die schwache Sodalösung die Zerstörung der Wachshülle fördert und damit das Eindringen aus dem Nährboden der lipoidhaltigen Stoffe, die auflösend auf die Tuberkelbazillen einwirken, erleichtert. Die Frage über die Bakteriolyse der Tuberkelbazillen ist noch nicht aufgeklärt. Ein so angesehener Tuberkuloseforscher wie Löwenstein bestreitet im wesentlichen diese Erscheinung. Es ist nicht Aufgabe unserer jetzigen Mitteilung, diese Frage genauer zu untersuchen; in dieser Hinsicht wird von uns eine besondere Mitteilung veröffentlicht; wir haben hier etwas ausführlicher diese Frage auseinandergesetzt, weil es sich um das Schicksal der Tuberkelbazillen im Einährboden nach Besredka handelt.

Nährboden nach S. A. Petroff.

Der Nährboden wird unter Beachtung aller aseptischen Kautelen hergestellt aus 2 Teilen Eier (Eiweiß und Eigelb), 1 Teil Fleischsaft und 1 Proz. einer alkoholischen Gentianaviolettlösung (1:10000). Dieses Gemenge wird vorsichtig mit einem Glasstab 10—15 Min. lang, bis zur Gewinnung einer homogenen Emulsion, gerührt, in Reagenzröhrchen abgefüllt und bei 90° während einer halben Stunde schräg erstarrt. Hierauf wird der Nährboden an 3 Tagen bei 80° eine Stunde sterilisiert. Nach dem 3. Tage werden die Wattepfropfen paraffiniert; zur Sterilitätsprüfung bleiben die Röhrchen mit dem Nährboden 3—4 Tage lang im Thermostaten bei 37° stehen; Röhrchen mit verunreinigten Nährböden wurden ausgeschlossen. Der auf diese Weise gewonnene Nährboden, der oft das Aussehen einer Landkarte wegen des Gehaltes

an Fleischsaft hatte, wurde mit je einer Reinkultur von Tuberkelbazillen (vom Typus humanus und Typ. bovinus) beimpft. Nach 12 Tagen Thermostataufenthalt bei 38° erscheinen ziemlich scharf ausgeprägt auf der Oberfläche des Nährbodens kleine Knötchen, teils einzeln, teils zusammengeflossen. Bei weiterem Thermostataufenthalt konnten wir nach 7—8 Tagen beobachten, daß die Knötchen größer wurden, teilweise rosafarben pigmentiert waren und Neigung zum Zusammenfließen mit Nachbarknötchen hatten; es entstand ein trockener Belag. Bei der Untersuchung der aus diesem Knötchen und Belag gemachten und nach Ziehl gefärbten Ausstrichpräparate konnten wir eine Reinkultur von Tuberkelbazillen mit der typischen Anordnung in Form von Zöpfen, Bündeln und Fäden nachweisen. Die folgenden Generationen, die durch Ueberimpfung gewonnen waren, haben keine wesentlichen Veränderungen gezeigt, nur das Wachstum war nicht so üppig, und die Knötchen waren kleiner und sahen gelblichweiß aus. Nach diesen Vorversuchen haben wir Beimpfungen aus tuberkelbazillenhaltigen Sputa angelegt. Das Sputum wird vor der Impfung mit einer gleichen Menge 3proz. Natronlaugelösung gemengt und in den Thermostat auf 12—18 Std., je nach der Konsistenz des Sputums, gestellt. Hierauf wird das alkalische Sputum mit starker Salzsäurelösung neutralisiert. Die neutrale Reaktion auf dem Lackmuspapier entspricht meistens dem Ausfall eines flockigen weißlichen Niederschlags. Nach dem Auftreten des Niederschlages wird das Sputum zentrifugiert, und aus dem Sediment mittels einer Pipette reichlich auf den Petroffschen Nährboden geimpft. Trotz aller Vorsicht waren aber zahlreiche Impfungen durch Nebenbakterien verunreinigt, besonders bei reichlichem Gehalt der letzteren im Sputum. Scheinbar sind unsere Homogenisationsmittel nicht imstande, die standhaften Mikrobenformen zu zerstören; dagegen gelang es, bei geringem Gehalt des Sputums an Begleitbakterien, nach 20—30tägigem Thermostataufenthalt bei 38° eine Reinkultur von Tuberkelbazillen zu erhalten.

Makroskopisch erwies sich das Wachstum nicht üppig, meistens aus kleinen Knötchen von gelblich-weißer Farbe bestehend. Bei mikroskopischer Untersuchung der nach Ziehl gefärbten Präparate konnten wir im ganzen Gesichtsfelde einzeln und gruppenweise gelagerte Tuberkelbazillen beobachten, nie aber gelang es uns, eine typische Anordnung in Form von Zöpfen und Fäden nachzuweisen. Die folgenden Ueberimpfungen zur Gewinnung neuer Generationen gaben uns keine günstigen Resultate, trotz vielfacher Versuche in dieser Richtung. Aehnliche Ergebnisse bekamen wir auch bei Impfung mit tuberkulösem Material (Lymphdrüsen) von tuberkulösen Meerschweinchen. Die exstirpierten Lymphdrüsen wurden mit einer Pinzette zerkleinert und dann sorgfältig auf die Oberbläche des Nährbodens eingerieben. Zwischen 12.—15. Tage trat Wachstum von Tuberkelbazillen ein, das zwischen 35. und 40. Tage Thermostatenaufenthalt sein Maximum erreichte, nie aber solche Größe bekam, wie bei der Impfung von Laboratoriumskulturen. Der Petroffsche Nährboden trocknet schnell aus, was schon von den ersten Tagen des Stehens im Thermostaten an beginnt. Das Austrocknen kann man auch bei Aufbewahrung des Nährbodens im dunkeln und feuchten Orte, selbst bei Verschluß mit paraffinierten Wattepfropfen beobachten. Dieser Umstand verhindert wesentlich das Wachstum der Tuberkelbazillen auf der ganzen Oberfläche des Nährbodens.

Oben haben wir erwähnt, daß wir bei der Impfung von Sputum und Organen von tuberkulösen Meerschweinchen auf den Petroffschen Nährboden keine neue Generationen bei den Ueberimpfungen bekommen haben, während wir bei der Impfung der Laboratoriumskultur, die mehrmals auf Glyzerinagar überimpft war, neue Generationen wenn auch mit schwachem Wachstum, erzielen konnten. Scheinbar ist die alte akklimatisierte Laboratoriumskultur standhafter und weniger empfindlich gegen verschiedene degenerative Prozesse, die sich im Zellkörper unter Wirkung der chemischen Zerfallsprodukte des Nährbodens selbst abspielen können. Die Zerfallsprodukte üben eine schädliche Wirkung auf die junge, frisch gewonnene Kultur aus, wobei ihre Fähigkeit zu weiteren Generationsbildungen gehemmt wird. Es ist wohl möglich, daß wir es hier mit einer Degenerationserscheinung zu tun haben, die jedem lebenden Organismus eigentümlich ist. Zur Erklärung dieser wichtigen Frage sind spezielle Untersuchungen notwendig, die wir demnächst unternehmen werden.

Nährboden nach Zechnowitzer.

Der Nährboden besteht aus 70 Proz. gut vermengtem Hühnerei, 20 Proz. sterilisierten destillierten Wassers und 20 Proz. Glyzerin. Abfüllen des Nährbodens in sterile Reagenzgläser und Sterilisierung an 3 Tagen je $^1/_2$ Std. bei 70°. Dann werden die Reagenzgläser mit dem Nährboden paraffiniert und in den Thermostaten auf 5 Tage gestellt, um ihre Sterilität zu kontrollieren. Auf Grund seiner Untersuchungen kommt Zechnowitzer zu dem Schluß, daß sein Nährboden bequem, einfach und geeignet für Gewinnung einer Erstkultur von Tuberkelbazillen ist, obwohl das Wachstum der folgenden Generationen geringer, doch aber möglich ist. In seiner Arbeit erwähnt Zechnowitzer zwar die Autoren, die vor ihm Einährböden vorgeschlagen haben, übersieht aber hierbei den Petroffschen Nährboden, der sich nur wenig von dem seinigen unterscheidet. Anstatt des Fleischsaftes bei Petroff fügt Zechnowitzer zu seinem Nährboden Glyzerin hinzu. Auf Grund unserer Untersuchungen bietet der Nährboden nach Zechnowitzer keine Vorzüge gegenüber dem Petroffschen Nährboden.

Die folgenden Generationen gediehen in unseren Versuchen auf dem Petroffschen Nährboden besser als auf dem Nährboden nach Zechnowitzer, auf welchem die 4.—5. Generation fast gar nicht gelang, während die 2.—3. Generation sich durch schwaches Wachstum auszeichnete. Versuche der Ueberimpfung der Kulturen vom Nährboden nach Zechnowitzer auf den Petroffschen und umgekehrt gaben uns ganz günstige Resultate im Sinne des Wachstums der Kulturen auf beiden Nährböden. Man konnte am Ende der 3.—4. Woche ein ganz üppiges Wachstum von einzeln stehenden oder zusammengeflossenen, gelblich-weißlichen Knötchen beobachten. Züchtungsversuche aus tuberkelbazillenhaltigem Sputum ergaben ähnliche Resultate wie auf dem Petroffschen Nährboden. Passagezüchtungen von Tuberkelbazillen gelangen sehr selten, und nur in einzelnen Fällen bekamen wir weitere Generationen mit schwachem Wachstum und spärlichem Bakteriengehalt. Ferner ist zu bemerken, daß der Nährboden nach Zechnowitzer länger aufbewahrt werden kann, mehr Kondenswasser enthält, weniger beim Stehen im Thermostaten austrocknet als der Petroffsche Nährboden. Diese Eigenschaft ist vielleicht durch

den Zusatz von 28 Proz. Aqu. dest. zu erklären. Es ergibt sich somit kein wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Einährböden nach Petroff und Zechnowitzer.

Kartoffelnährboden.

Wir haben eingangs erwähnt, daß Pawlowsky schon vor Jahren den Kartoffelnährboden vorgeschlagen hat. Es gelang ihm, 10—12 Tage nach der Beimpfung Wachstum von Tuberkelbazillen zu erzielen. Dieser Nährboden wurde von uns in folgender Weise modifiziert: Zu 50 Teilen Hühnerei fügten wir 10 Teile zerriebene Kartoffeln, 4 Teile Glyzerin und 36 Teile Pferdeserum. Die Kartoffeln wurden bei der Zubereitung abgeschält, dann sorgfältig in Karbollösung gewaschen und auf einem Reibeisen unmittelbar in einen Zylinder gerieben. Die ganze Prozedur wurde in einem sterilen Zimmer unter Beobachtung aller aseptischen Vorsichtsmaßregeln ausgeführt. Der auf diese Weise gewonnene Nährboden wurde in Reagenzgläschen gegossen, im Koagulationsapparat bei 85° erwärmt und dann in demselben Apparat 3mal bei 75—80° je $^1/_2$ Std. sterilisiert. Der Nährboden wurde hierauf in der üblichen Weise auf Sterilität geprüft. Das Wachstum der Tuberkelbazillen war auf diesem Nährboden sehr karg, aus kleinen Knötchen von weißlicher Farbe bestehend. Weitere Generationen ließen sich gar nicht erzielen. Da die Resultate sehr ungleich ausfielen, verließen wir bald diesen Nährboden. Eine ganze Reihe von weiteren Versuchen, die wir mit verschiedenen Nährböden angestellt haben, seien hier nicht geschildert; sie zeigten uns wieder, daß Wachstum der Tuberkelbazillen nur in Gegenwart von Lipoidsubstanzen und Phosphorsalzen möglich ist, da die Tuberkelbazillen zu diesen Substanzen eine besondere Affinität besitzen.

Nährboden aus Ochsenhoden.

Während die chemische Zusammensetzung des Hühnereies genügend bekannt ist, ist die Natur des Hodengewebes noch weniger aufgeklärt. Jedenfalls ist bekannt, daß zwischen Hühnerei und Hodengewebe des Tieres viel Gemeinsames trotz biologischer Grunddifferenzen vorhanden ist. Beide enthalten Fett, Leucin, Thyrosin, Cholesterin, Lecithin, Phosphorsalze, Kali-, Mangan-, Natrium- und Kalziumsalze. Was das Sperma anbetrifft, so ist es dem Eigelb sehr ähnlich und enthält analog dem Eigelb Eiweißsubstanzen, wie Nuklein, Lezithin, Cholesterin und Fett. Das Ochsensperma ist durch seine saure Reaktion ausgezeichnet. Die so nahestehenden chemischen Eigenschaften beider Substanzen legten uns den Gedanken nahe, das Ochsenhodengewebe als Nährboden zur Gewinnung einer Reinkultur von Tuberkelbazillen zu verwenden; es sollte auf diese Weise das kostbare Eimaterial durch das billigere und mehr zugängliche Material ersetzt werden. Die vom Schlachthofe gebrachten Hoden wurden enthüllt, dann durch die Fleischhackmaschine zerkleinert, hierauf durch die zur Bereitung der Pockenlymphe dienende elektrische Mühle von neuem zermahlen. Zu 2 Teilen der gemahlenen Hodenmasse wurde 1 Teil frischen Rinderserums hinzugefügt. Abfüllen in Reagenzgläschen und Sterilisieren in schräger Lage im Autoklaven bei 110° während 20 Minuten. Bei späteren Versuchen gingen wir in der Weise vor, daß wir zuerst im Serumerstarrungsapparat bei 90° und dann an 3 Tagen bei 80—85° je $^1/_2$ Stunde sterilisierten. Nach der Sterilitätsprüfung wurden die Nährböden mit

Reinkulturen von Tuberkelbazillen beimpft. Nach 15—20tägigem Brutschrankaufenthalt bei 38° bekamen wir ein üppiges Wachstum in Form von gelblich-weißlichen Knötchen, die beim Typus humanus mit der Zeit einen Rosaton annahmen. Die Versuche, aus Sputum Tuberkelbazillen zu züchten, gaben uns gleichfalls bessere Resultate, als die früheren Versuche mit anderen Nährböden. Es zeigte sich hierbei, daß das Hodengewebe weniger durch Nebenkeime verunreinigt und viel weniger der Verunreinigung unterworfen war, als die Nährböden nach Petroff und Zechnowitzer. Es gelang uns auch viel leichter, weitere Generationen zu erzielen, wobei wir keine Abnahme der Wachstumsenergie beobachteten. Wir benutzen seitdem mit bestem Erfolg unseren Nährboden zur Erhaltung der Laboratoriumsstammkulturen. Was die Versuche mit den aus Sputum gezüchteten Kulturen anbetrifft, so haben wir auch hier befriedigende Resultate bekommen; die Gewinnung neuer Generationen geht auf ihm viel leichter vor sich, als auf dem Nährboden nach Petroff und nach Zechnowitzer, sowie ganz besonders auf dem nach Besredka. Wir rechnen 7—8 Generationen, die sehr wenig in ihrem Charakter und Wachstum gelitten haben. Leider konnten wir bis jetzt kein anderes tuberkelbazillenhaltiges Material außer Sputum zu Impfzwecken auf unseren Nährboden anwenden, wir können aber sagen, daß in dieser Hinsicht unser Nährboden große Dienste leisten kann. Wir sind weit davon entfernt, unsern Nährboden als streng spezifisch zur Gewinnung einer Tuberkelbazillenreinkultur zu bezeichnen, wir möchten nur auf diesen Nährboden aufmerksam machen, da er sehr einfach, billig und brauchbar ist.

Zusammenfassung.

1) Der flüssige Einährboden nach Besredka eignet sich nicht zur Züchtung von Tuberkelbazillen, da auf diesem Nährboden die Tuberkelbazillen, insbesondere die aus Sputa gezüchteten, einem der Bakteriolyse ähnlichen Prozeß unterworfen werden, wobei die Menge der Bazillen sich verkleinert, die Bazillen selbst in körnige Bildungen sich umwandeln, die sich nach Much-Weiß färben. Weiteres Studium wird uns die Natur dieser körnigen Bildungen näher erklären können. 2) Der feste Einährboden nach Petroff stellt ein ganz günstiges Nährsubstrat für das Wachstum und Gedeihen akklimatisierter Laboratoriumskulturen der Tuberkelbazillen dar. 3) Die Weiterimpfung von aus tuberkulösem Sputum frisch gewonnenen Kulturen gab auf diesem Nährboden ein negatives Resultat. 4) Der Nährboden nach Zechnowitzer unterscheidet sich nur wenig von dem Petroffschen Nährboden; es gelang uns in einigen Fällen, 2—3 Generationen von Tuberkelbazillen zu bekommen, die aus tuberkulösem Sputum gezüchtet waren. Von Vorteil ist bei diesem Nährboden, daß er weniger leicht als der Petroffsche austrocknet, was die Aufbewahrung der Kultur erleichtert. 5) Ein aus Ochsenhoden hergestellter Nährboden lieferte uns sehr günstige Resultate bei der Gewinnung von Erstkulturen des Tuberkelbazillus. Dieser Nährboden hat den Vorzug außerordentlicher Billigkeit gegenüber den Hühnereinährböden. Außerdem eignet er sich für die Weiterzüchtung frisch gewonnener Kulturen.

Ueber die serologischen Beziehungen des B. typhi spermophilorum und B. Danysz zu den übrigen Vertretern der Bakterien der Coli-Typhusgruppe und über ihre Variabilität.

[Aus dem Bakteriologischen Laboratorium des Leningrader landwirtschaftl. wissenschaftl. Instituts (Leiter: Prof. M. Tartakowsky).]

Von Prof. **B. Ebert**.

Die vorliegende Arbeit, die in den „Arbeiten des landwirtschaftlich-bakteriologischen Laboratoriums des Ackerbauministeriums zu St. Petersburg", Bd. VI, H. 9 erschienen ist, ist eigentlich eine Fortsetzung der Arbeit „Ueber das Verhalten der Bouillon- und Eiweißrasse des Bazillus des Zieselmäusetyphus Mereschkowsky (B. typhi spermophilorum) zu einigen Vertretern der Coli-Typhus-Gruppe"[1]). Zu der weiteren Bearbeitung des erwähnten Themas veranlaßten mich sowohl die außerordentlich interessanten biologischen Eigenschaften des Bacillus Mereschkowsky, die schwache Entwicklung seiner Gärungsfähigkeit, die eine scharfe Grenze zwischen ihm und den übrigen, für Nagetiere pathogenen Bakterien zieht, als auch die Möglichkeit, dank dem liebenswürdigen Anerbieten S. S. Mereschkowskys, diese Untersuchung gleichzeitig mit 2 Rassen auszuführen. Diese Rassen wurden durch tägliche Ueberimpfungen in Bouillon bzw. 10proz. Eiweißdekokt gewonnen. Eiweißdekokt ist ein Nährboden, welcher die Eigenschaft besitzt, die Virulenz des Bac. typhi spermophilorum (und auch des Bac. Danysz) zu erhalten[2]). In der oben erwähnten Arbeit kam ich zu folgenden Ergebnissen: 1. Tägliche Bouillonpassagen des Bac. typhi spermophilorum steigern die Agglutinabilität der Bouillonrasse, indem sie auf die Antigeneigenschaften des Bac. Mereschkowsky im strengen Sinne des Wortes nicht einwirken. 2. Die bei der Immunisierung von Kaninchen und Hammeln gewonnenen Sera reagieren spezifisch nur mit beiden Rassen des Bac. Mereschkowsky, wobei in der Agglutinationsreaktion die Bouillonrasse und in der Komplementbindungsreaktion die Eiweißrasse schärfer reagierte. Die Bouillonrasse besitzt auch eine schärfer ausgeprägte spezifische Agglutininbindungsfähigkeit (in dem Castellanischen Absorptionsversuch). 3. Auf Grund der Gruppen-Serumreaktionen muß man den Bac. Mereschkowsky in die Nachbarschaft des Bac. Issatschenko, Bac. enteritidis Gärtner, Bac. Danysz, Bac. Dunbar und Bac. typhi abdominalis bringen.

Die Verwandtschaft mit der letzten Art wurde bei der Arbeit mit Kaninchensera festgestellt; sie tritt erst in der Komplementbindungsreaktion deutlicher hervor. Auf die anderen Schlußfolgerungen, die für diese Arbeit nicht von Bedeutung sind, will ich nicht näher eingehen.

1) Ibidem. Bd. 5. Nr. 12.
2) Ibidem. Bd. 3. Nr. 4, und Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 65. H. 4/5.

Nachdem die oben erwähnte serologische Charakteristik der Bouillon- und Eiweißrasse des Bac. Mereschkowsky festgestellt war, nahm ich mir vor, das Verhalten der Bac. Mereschkowsky-, Danysz-, Gärtner-, Typhus-, Paratyphus A- und Paratyphus B-Sera zu erforschen.

Während die Untersuchung der spezifischen Danysz-Sera mit verschiedenen Stämmen gleichartiger Bakterienarten ausgeführt wurde, wurde diejenige aller übrigen Sera auf einen Stamm der betr. Bakterienarten beschränkt, was mit Rücksicht auf die damaligen Verhältnisse gemacht werden mußte. Nach Beendigung der Versuche mit den Mereschkowsky-Sera entschloß ich mich nach Beratung mit S. S. Mereschkowsky, täglich Bouillon- und Eiweißdekoktpassagen auch mit anderen Kulturen der Coli-Typhus-Gruppe anzulegen, und zwar mit Bac. typhi abdominalis, Bac. paratyphi A und B, Bac. enteritidis Gärtner und Bac. murium Loeffler. Infolge der ausgeprägten Veränderlichkeit der Paratyphusbakterien konnte man erwarten, daß die Eiweißdekoktpassagen auf die biologischen Eigenschaften der genannten Bakterien einwirken würden. Die unter gewöhnlichen Bedingungen aufbewahrten gleichnamigen Agarkulturen mußten als Kontrolle dienen. In dieser Weise waren die Antigeneigenschaften jeder Art bei den 3 verschiedenen Varianten (Bouillon, Dekokt- und Agarrassen) zu untersuchen. Die Befürchtung einer zu großen Ansammlung von Material bei solcher Versuchsanordnung zwang mich, nur 1 Vertreter für jede einzelne Bakterienart zu untersuchen, jedoch, wie gesagt, in 3 Varianten. Die Antigeneigenschaften dieser Varianten wurden nach Beendigung der Versuche mit den Danysz-Sera studiert. Ich will noch erwähnen, daß ich infolge der Kriegszustände genötigt war, eine 2jährige Pause zwischen den Untersuchungen mit den Danysz-Sera und den übrigen weiter auseinanderzusetzenden Forschungen zu machen.

Material und Methodik.

Die Bakterienkulturen, die ich benutzte (s. Tab. I u. II), waren fast dieselben wie in meiner 1. Arbeit; zu den Untersuchungen mit den Danysz-Sera wurden nur einige neue Stämme hinzugefügt, und zwar:

Bezeichnung der Kultur.	Wann und wo sie gewonnen wurde:
Bac. paratyhi B (Achard u. Bensaude)	1911 aus dem Laboratorium Králs in Prag
Bac. paratyphi A (Brion u. Kayser)	1910 desgleichen
Bac. paratyphi A (Müller)	1911 „
Bac. typhi abdomin. (Leishman)	1912 von Prof. Leishman aus London durch Prof J. F. Raptschewsky
Bac. enteritidis Gärtner Nr. 603	Aus der Bakt. Abt. des Reichsgesundheitsamts in Berlin.

Die oben erwähnten Bouillon- und Eiweißdekokt-Passagen wurden mit Kulturen des Bac. typhi abdominalis (Král), Bac. paratyphi A (Date), Bac. paratyphi B (Busse), Bac. enteritidis Gärtner (Nr. 710) und Bac. typhi murium Loeffler (Nr. 10) ausgeführt, wobei die Ausgangskultur für die Bouillon- und Eiweißgenerationen durch Abimpfung von einer morphologisch (auf Gelatineplatte) einwandfreien Kolonie angefertigt wurde.

Die Reinheit der Bouillon- und Dekoktkulturen wurde von Zeit zu Zeit in der üblichen Weise kontrolliert. Die Zahl der Bouillon- und Ei-

weißgenerationen ergibt sich zu Beginn dieser Arbeit aus nachstehender Uebersicht:

Bezeichnung der Kultur	Zahl der Generationen	
	in Bouillon	in 10proz. Eiweißdekokt
Bac. typhi abdominalis	727	757
„ paratyphi A	667	670
„ „ B	150	458
„ enteritidis Gärtner	458	458
„ typhi murium Loeffler	458	458
„ „ spermophilorum	1328	725
„ Danysz Ser. 39 und 40	1504	1570
„ „ „ D 3	1338	1337

Die Methodik der Agglutinations- und Komplementbindungsreaktion war die gleiche, wie ich sie in der Arbeit „Ueber Paratyphus und Typhus bei Vögeln" beschrieben habe[1]). Die Kaninchen wurden intravenös mit abgetöteten Kulturen in steigenden Dosen immunisiert.

Bezüglich der serologischen Charakteristik des Bac. spermophilorum und des Bac. Danysz führe ich folgende Angaben aus der Literatur an.

Ich beginne mit dem Bac. Mereschkowsky, der, soviel mir bekannt ist, in serologischer Hinsicht wenig untersucht worden ist. Die Arbeiten des japanischen Autors C. Nichino[2]) können nicht berücksichtigt werden, da aus den Beschreibungen z. B. Koais[3]) ersichtlich ist, daß der von ihm untersuchte Mikroorganismus seiner Gärungsfähigkeit nach nichts gemein mit dem echten Bac. typhi spermophilorum hatte, was auch durch meine oben erwähnte Arbeit bewiesen wurde. Infolgedessen erlaube ich mir, ohne die Ergebnisse Nichinos anzuführen, die Resultate meiner obigen Arbeit zu erwähnen, welche die Zugehörigkeit des Bac. Mereschkowsky zur Gruppe des Bac. enteritidis Gärtner und nicht zu der Gruppe des Bac. paratyphi B und des Bac. typhi murium, wie der erwähnte japanische Autor behauptet, bestätigen. Die Tatsache, daß der Bac. Mereschkowsky zur Gärtner-Gruppe gehört, hat sich in meiner weiteren Arbeit nicht nur bestätigt, sondern bekam im Zusammenhang mit einigen ergänzenden Ergebnissen theoretisches Interesse und praktische Bedeutung.

Bac. Danysz ist hinsichtlich seiner serologischen Eigenschaften eine Art, die unvergleichbar mehr untersucht wurde, seine Zugehörigkeit zur Gruppe B. enteritidis II (Typus Gärtner) steht danach außer Zweifel. Es gibt zahlreiche Arbeiten über die kulturellen, morphologischen und biologischen Eigenschaften ververschiedener Mikroben, die zur Mäuse- und Rattenvertilgung, darunter auch den B. Danysz, empfohlen werden. Erwähnt seien hier in chronologischer Reihenfolge folgende Autoren: 1) H. Trautmann[4]); 2) L. Bahr, H. Raebiger und G. Gosso[5]); 3) Xylander[6]); 4) Mühlens, Dahm und Fürst[7]); 5) F. Lebram[8]); 6) K. Altmann[9]); 7) Sobernheim und E. Seligmann[10]); 8) Steffenhagen[11]); 9) K. Schern[12]).

1) Ebert, B., u. Schulgina, O., Ueber Paratyphus und Typhus bei Vögeln. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 91. H. 7—8.)
2) Ztschr. f. Hyg. Bd. 69. 1911. S. 92.
3) Bull. of College of Agricult. Tokyo. Vol. 4. 1902. p. 299.
4) Ztschr. f. Hyg. Bd. 54. 1906. S. 104.
5) Ztschr. f. Infektionskrankh. d. Haust. Bd. 5. S. 295.
6) Arb. a. d. Kais. Ges.-Amt. Bd. 28. S. 145.
7) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 48. S. 1.
8) Ibidem. Bd. 50. S. 315.
9) Ibidem. Bd. 54. S. 174.
10) Ztschr. f. Imm. Bd. 7. S. 342.
11) Arb. a. d. Kais. Ges.-Amt. Bd. 36. S. 198.
12) Ibidem. Bd. 30. S. 575.

Die Arbeiten dieser Autoren genügen völlig zu der Schlußfolgerung, daß unter den Rattenepizootieerregern die Bakterien, die zur Gruppe des Bac. enteritidis Gärtner gehören, eine große Rolle spielen, und daß man Bac. Danysz und Bac. Issatschenko und auch den von diesen biologisch so verschiedenen Bac. Mereschkowsky zu ein und derselben Gruppe rechnen muß.

Untersuchungen mit Danysz-Kaninchen-Immunsera.

Ich verfügte über 6 Kaninchen, die mit Danysz-Kulturen immunisiert waren, wovon 3 mit vollvirulenten Rassen (Eiweiß) und 3 mit avirulenten (Bouillon) immunisiert wurden. Die gewonnenen Ergebnisse sind in den Tabellen Nr. 1 und Nr. 2 niedergelegt. In der Tabelle Nr. 1 haben wir die Ergebnisse der Agglutinationsreaktion und in der

Tabelle I.

Nr.	Bezeichnung der Bakterienkulturen, die der Agglutination ausgesetzt wurden.	Nr. der Kaninchen und Bezeichnung der Kulturen, mit welchen die Kaninchen immunisiert wurden					
		I	II	V	VI	VII	VIII
		B. Danysz-Ser. 39	B. Danysz-Ser. 40	B. Danysz-Ser. 39	B. Danysz-Ser. 40	B. Danysz D_3, Bouillonrasse	B. Danysz D_3, Eiweißrasse
1	B. Danysz-Stamm 39, Bouillonrasse	8 000	7 000	12 000	32 000	28 000	5 000
2	B. Danysz-Stamm 40, Eiweißrasse	28 000	40 000	20 000	80 000	48 000	44 000
3	B. Danysz-Stamm D_3, Bouillonrasse	14 000	22 000	12 000	92 000	34 000	44 000
4	B. Danysz-Stamm D_3, Eiweißrasse	28 000	36 000	14 000	88 000	36 000	44 000
5	B. Mereschkowsky-Stamm 85, Bouillonrasse	28 000	60 000	5 000	96 000	22 000	4 000
6	B. Mereschkowsky-Stamm 85, Eiweißrasse	22 000	58 000	5 000	110 000	14 000	5 000
7	B. Issatschenko	28 000	42 000	12 000	110 000	30 000	20 000
8	B. Dunbar	6 000	18 000	4 000	2 000	20 000	9 000
9	B. Loeffleri (Nr. 10)	2 000	1 000	0	100	0	100
10	B. enter. Gärtner (Nr. 603)	28 000	34 000	10 000	80 000	28 000	28 000
11	B. enter. Gärtner (Nr. 710)	28 000	34 000	10 000	72 000	26 000	20 000
12	B. parat. B (Achard u. Bensaude)	3 000	6 000	2 000	0	500	2 000
13	B. parat. B (Busse)	100	0	0	0	0	0
14	B. parat. B Klimenko	2 000	2 000	0	0	0	0
15	B. parat. B (Kondo)	0	100	0	0	0	0
16	B. parat. A (Brion u. Kayser)	0	4 000	5 000	0	500	300
17	B. parat. A (Date)	1 000	0	0	0	0	0
18	B. parat. A Müller (1)	100	0	0	0	1 000	500
19	B. typhi abd. (Král)	0	1 000	0	1 000	0	500
20	B. typhi abd. (Leishman)	2 000	1 000	2 000	2 000	300	1 000
21	B. coli commune (Král)	0	0	0	0	0	100

Tabelle Nr. 2 die Komplementbindungsreaktion aufgeführt. Zur Zahlenbezeichnung der Komplementbindungsfähigkeit der verschiedenen Antigene wurde folgendes Prinzip angenommen: Wir stellten jeden Versuch mit 4 Antigendosen an, wobei jede Antigendose mit 4 fallenden

Serumdosen geprüft wurde. Die Summe der Kreuze, die den Grad der Hämolysehemmung des Serums bezeichnet, die bei 4 Dosen Serums mit 4 Antigendosen zustande kam, dient zur gleicher Zeit auch zur Bezeichnung der komplementbindenden Eigenschaften des gegebenen Antigens mit dem gegebenen Serum.

Analysieren wir die Tabellen, so bemerken wir, daß der Unterschied der agglutinogenen Eigenschaften der Bouillon- (avirulenten) und Eiweißrassen (virulenten) des Bac. Danysz nicht deutlich ausgesprochen ist; doch sind anscheinend die agglutinogenen Eigenschaften der Eiweißrassen schärfer ausgesprochen. Dasselbe kann man auch von der Agglutinabilität beider Rassen sagen. Im allgemeinen schwankt die Agglutinabilität der verschiedenen Rassen des Bac. Danysz, in einzelnen Fällen nähert sie sich den Agglutinationstitern anderer Vertreter der Coli-Typhus-Gruppe, z. B. des Bac. paratyphi B. Würde man, wie oben erwähnt, die Durchschnittszahlen, die die Titerhöhe bezeichnen, berechnen und die Zahlen in einer Kurve darstellen, so würde man sehen, daß die höchsten Agglutinationstiter dem Bac. Issatschenko, dem Bac. Mereschkowsky, dem Bac. Danysz und dem Bac. Gärtner zukommen. Die Titer dieser 4 Bakterienarten stehen einander nahe (1:40000; 1:36000; 1:34000; 1:33000). Bac. Dunbar wird in einer bedeutend niedrigeren Verdünnung agglutiniert (1:10000), während Bac. typhi abdominalis, Bac. paratyphi und Bac. Loeffler kaum nennenswert beeinflußt werden. Bac. coli commune wird durch die Danysz-Sera gar nicht agglutiniert. Es ist somit klar, daß es mit Hilfe der Agglutinationsreaktion unmöglich ist, den Bac. Danysz vom Bac. Issatschenko und Bac. enteritidis Gärtner zu unterscheiden. Was den Bac. Mereschkowsky anbetrifft, so wurde er durch eines der Danysz-Sera am höchsten agglutiniert (Kaninchenserum Nr. 2); fast ebenso verhielt sich Kaninchenserum Nr. 6, das den Bac. Issatschenko und den Bac. Mereschkowsky am höchsten agglutiniert. Im Castellanischen Absorptionsversuch erwies sich dieses dann gewissermaßen spezifisch für Bac. Mereschkowsky; wir haben also hier einen Fall von einer stark ausgeprägten unspezifischen Immunreaktion, die mit einem heterogenen Antigen gewonnen wurde, das sich in seinen biologischen Eigenschaften von den homologen unterschied. Was die übrigen Gruppenreaktionen anbetrifft, so habe ich dieselben schon erwähnt; ich will nur hinzufügen, daß die verschiedenen Paratyphi A und B, sowie auch die Typhusstämme außerordentlich verschieden mit den Danysz-Sera reagierten. Von den Bakterien der Paratyphus B-Gruppe wurden am stärksten Achard und Bensaude, von den Paratyphus A-Bazillen Brion und Kayser, von der Typhusgruppe Leishman agglutiniert.

Was für Schlußfolgerungen kann man aus dem Gesagten ziehen? Vor allem fällt die außerordentlich verschiedene Agglutinabilität der verschiedenen Rassen des Bac. Danysz auf, die bei ein und demselben Serum in weiten Grenzen schwanken kann. Ferner beobachteten wir bei einem Danysz-Serum auf hohem Titer eine starke unspezifische Reaktion. Ein anderes, gleichfalls hochwertiges Serum, gab eine Reaktion mit dem heterogenen Antigen in derselben Verdünnung wie mit dem homologen. Die Sera mit niedrigerem Titer arbeiteten dagegen spezifischer. Wir können deshalb den diagnosti-

schen Vorteil von Seren mittlerer Stärke bestätigen, eine in bezug auf die Präzipitinreaktion bekannte Tatsache.

Ich gehe nunmehr zur Analyse der Ergebnisse über, die die gleichen Seren bei Anwendung der Komplementbindungsreaktion gaben.

Die beobachteten Hämolysehemmungen verteilen sich folgendermaßen: den stärksten Hemmungsgrad gaben: Bac. Issatschenko, Bac. Mereschkowsky, Bac. enteritidis Gärtner und Bac. Danysz, ferner Bac. typhi abdominalis, Bac. paratyphi A, Bac. typhi murium Loeffler, Bac. paratyphi B, Bac. Dunbar. Bac. coli commune gab kein positives Resultat. Wir sehen also, daß die Komplementbindungsreaktion dieselben Verhältnisse mit einigen Abweichungen aufweist, wie die Agglutinationsreaktion.

Wenn wir zu einer genaueren Betrachtung der Ergebnisse übergehen, die in der Tabelle Nr. 2 dargestellt sind, bemerken wir sofort,

Tabelle II.

Nr.	Kulturen, die als Antigen dienten	Nr. der Kaninchen und Bezeichnung der Kulturen, mit denen die Kaninchen immunisiert wurden					
		I	II	III	IV	V	VI
		B. Danysz-Ser. 39	B. Danysz-Ser. 40	B. Danysz-Ser. 39	B. Danysz-Ser. 40	B. Danysz-Ser. D$_3$, Bouillonrasse	B. Danysz-Ser. D$_3$, Eiweißrasse
1	B. Danysz-Stamm 39, Bouillonrasse	13	6	24	3	13	2
2	B. Danysz-Stamm 40, Eiweißrasse	6	32	1	27	4	22
3	B. Danysz-Stamm D$_3$, Bouillonrasse	20	33	8	13	21	11
4	B. Danysz-Stamm D$_3$, Eiweißrasse	2	25	1	22	4	23
5	B. Mereschkowsky-Stamm 85, Bouillonrasse	36	63	4	33	14	12
6	B. Mereschkowsky-Stamm 85, Eiweißrasse	7	55	1	27	6	16
7	B. Issatschenko	11	46	24	30	13	18
8	B. Dunbar	1	14	1	4	3	5
9	B. Loeffler	7	18	1	6	3	12
10	B. enteritidis Gärtner (Nr. 603)	22	54	3	46	13	25
11	B. enteritidis Gärtner (Nr. 710)	14	34	8	11	5	12
12	B. parat. B (Achard u. Bensaude)	7	2	12	5	2	6
13	B. parat. B (Klimenko)	2	1	17	1	0	—
14	B. parat. (Busse)	1	15	12	7	0	—
15	B. parat. B (Kondo)	5	15	1	5	0	—
16	B. parat. A (Brion u. Kayser)	13	15	23	9	12	14
17	B. parat. A (Date)	2	3	0	1	0	—
18	B. parat. A (Müller)	13	1	1	0	4	—
19	B. typhi abdom. (Král)	1	21	0	17	2	—
20	B. typhi abdom. (Leishman)	19	7	20	28	15	—
21	B. coli commune (Král)	0	0	0	0	0	—

daß die Sera, welche die pseudospezifische Agglutinationsreaktion mit Bac. Mereschkowsky gaben, eine analoge Erscheinung auch in der Komplementbindungsreaktion aufweisen. Verschiedene Rassen des

Bac. Danysz waren verschieden, sowohl in bezug auf ihre Komplementbindungsfähigkeit als auch in bezug auf ihre Agglutinabilität. Die Hemmungen der Danysz-Sera mit verschiedenen Danysz-Stämmen waren oft schwächer, als mit anderen Vertretern der Coli-Typhus-Gruppe, doch fanden sich dabei für ein jedes einzelne Danysz-Serum unter den verschiedenen Danysz-Stämmen solche, die als Antigen eine stärkere Hemmung gaben, als irgendein anderer Vertreter der Coli-Typhus-Gruppe. Außerdem reagierten die Sera, die durch Immunisierung mit der Bouillonrasse gewonnen wurden, am stärksten mit den Bouillonrassen des Bac. Danysz, und umgekehrt reagierten Sera, die durch Immunisierung mit Eiweißrassen gewonnen wurden, am stärksten mit den Eiweißrassen. Dieses Verhältnis ist sehr deutlich bei Kaninchen Nr. 1, 5, 6, 7 und 8 ausgesprochen, teilweise auch beim Kaninchen Nr. 2. Das heißt, es handelte sich hier um eine zunehmende Spezifität des Bakterienantigens im Zusammenhang mit den besonderen Ernährungsbedingungen desselben Stammes.

Von den anderen untersuchten Arten gaben deutlich ausgesprochene Hämolysehemmungen dieselben Vertreter der Typhus- und Paratyphus A- und B-Gruppen, wie auch in der Agglutinationsreaktion. Im Vergleich zu den komplementbindenden Eigenschaften der gewonnenen Sera sind die antigenen Eigenschaften unter den verschiedenen Rassen des Bac. Danysz im allgemeinen bei den Eiweißrassen am deutlichsten ausgesprochen. Ferner sieht man bei der Betrachtung der Tabelle Nr. 2, daß bei Anwendung von Bouillon-Danysz-Seren die Grenzen zwischen den Gruppen Bac. paratyphi und Bac. enteritidis Gärtner weniger deutlich ausgesprochen sind, d. h. daß unter dem Einfluß des Wachstums in Bouillon der Bac. Danysz gleichzeitig mit dem Virulenzverlust auch seine Antigenspezifität einzubüßen beginnt. Auf diese Weise stellen wir fest. 1) daß unter dem Einfluß von besonderen Ernährungsbedingungen die Antigeneigenschaften der Bouillonrassen an ihrer Spezifizität eingebüßt haben — bei Anwendung von Bouillonsera sind die Grenzen zwischen der Gärtner- und Paratyphusgruppe verwischt; 2) daß unter dem Einfluß derselben Bedingungen die Antigeneigenschaften von Bouillon- und Eiweißrassen sich differenziert haben — eine aufkeimende Spezifizität der Danysz-Bouillonsera mit den Bouillonrassen des Bac. Danysz und umgekehrt. Die Erscheinung, welche in den Ergebnissen der Agglutinationsreaktion kaum bemerkbar war, tritt hier viel deutlicher hervor — eine Tatsache, die wir weiter wiederholt treffen werden. Ferner wurden bei Anwendung von „Eiweiß"-Danysz-Sera außerordentlich starke positive Reaktionen mit dem Bac. Mereschkowsky gewonnen. Unwillkürlich fragt man sich, ob diese Eigenschaft des Kaninchenorganismus, auf die Einführung des Bac. Danysz Antikörper zu produzieren, welche so scharf mit Bac. Mereschkowsky reagieren, nicht durch die Pathogenität des Bac. Danysz und des Bac. Mereschkowsky für nahestehende Tiere, wie es Mäuse und Ratten sind, erklärt werden kann.

Durch die angeführten Versuche wurde folgendes festgestellt: der Zusammenhang des Bac. Danysz mit der Gruppe des Bac. enteritidis Gärtner, die nahen Beziehungen dieses Bakteriums mit dem Bac. Mereschkowsky, wie auch die Verwandtschaft mit dem Bac. typhi abdominalis, hinter dem die

übrigen Vertreter der verschiedenen Arten der Paratyphusbakterien stehen.

Das wäre die Charakteristik des Bac. Danysz in serologischer Beziehung.

Zweiter Teil.

Im 2. Teil meiner Arbeit möchte ich die Untersuchungsergebnisse mit Kaninchensera besprechen, die mit Agar-, Bouillon- und Eiweißrassen des Bac. typhi abdominalis, Bac. paratyphi A, paratyphi B und Bac. enteritidis Gärtner gewonnen wurden. Es gelang mir nicht, ein Serum mit genügend hohem Titer mit der Bouillonrasse des Bac. typhi abdominalis zu gewinnen, infolgedessen mußte ich meine Untersuchungen auf „Agar"- und „Eiweiß"-Typhusserum beschränken. Wie ich schon erwähnte, wurden die genannten Sera sowohl mit den Bouillon- und Eiweißrassen des Bac. Danysz und des Bac. Mereschkowsky als auch mit den zur Herstellung der Kaninchensera verwendeten Vertretern der Coli-Typhus-Gruppe in allen Varianten (Agar, Bouillon und Eiweiß) geprüft.

Ich muß es mir versagen, eine Uebersicht über die bisher in der Literatur vorliegenden Arbeiten über die Veränderlichkeit der Eigenschaften der bakteriellen Antigene zu geben. Ich erwähne nur die Arbeit von Baerthlein: Ueber bakterielle Variabilität usw. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 81. S. 369), die ich erst nach Beendigung dieser Arbeit kennen lernte, und die meine vorstehenden Untersuchungen vollkommen bestätigt. Diese Uebereinstimmung ist um so wichtiger, als die Methodik des erwähnten Autors sich von der meinigen völlig unterscheidet; trotzdem ist es mir gelungen, mit einer ganz anderen Versuchsanordnung die Veränderlichkeit der antigenen Eigenschaften für die Vertreter der Coli-Typhus-Gruppe objektiv zu beweisen.

Wie verhalten sich nun die Bouillon- und Eiweißgenerationen des Bac. Mereschkowsky und Bac. Danysz zu den Sera, die spezifisch für Bac. typhi abdominalis, Bac. paratyphi A, Bac. paratyphi B und Bac. enteritidis Gärtner sind, und die zur Immunisierung der Kaninchen verwendeten Kulturen zu den genannten Seren? Hierbei ist zu berücksichtigen, daß die antigenen Eigenschaften einer jeden der Bakterienarten in 3 Varianten (Agar, Bouillon und Eiweißrasse) untersucht wurden; es betrug somit die Zahl der Sera 12, die der Kulturen 15, da auch die Agar-, Bouillon- und Eiweißgenerationen des Bac. typhi murium Loeffler untersucht wurden, mit denen kein Immunserum hergestellt worden war.

Zur Vereinfachung der Uebersicht will ich die Bakterienarten und die homologen Sera folgendermaßen bezeichnen: das 1. Adjektiv soll die Art der Kultur, das 2. die Rasse der Art bezeichnen. Z. B. soll der Ausdruck „Typhuseiweißserum" besagen, daß das Serum durch die Immunisierung mit der Eiweißrasse des Bac. typhi abdominalis gewonnen wurde.

Die Ergebnisse der Untersuchung der oben erwähnten Fragen will ich in einzelnen Tabellen darstellen und diese einzeln besprechen (Tabelle IV s. S. 257).

Die Tabelle IV stellt das Verhältnis des Bac. Mereschkowsky und Bac. Danysz zu den Typhus-, Paratyphus A- und B- und den Gärtner-Sera dar, die durch Immunisierung mit den gleichnamigen

Tabele IV.

Bezeichnung des aggl. Serums, mit dem die Reaktion ausgeführt wurde, und der Bakterienrasse, mit der das Serum hergestellt wurde		Bezeichnung der Kultur, ihrer Rasse und der Reaktion, die mit der Kultur ausgeführt wurde													
		Homolog. Sera						B. Mereschkowsky				B. Danysz			
		Agar	Bouillon	Eiweiß	Agar	Bouillon	Eiweiß	Bouillon	Eiweiß	Bouillon	Eiweiß	Bouillon	Eiweiß	Bouillon	Eiweiß
		Agglutination			Reaktion Bordet-Gengou			Agglutination		Reaktion Bordet-Gengou		Agglutination		Reaktion Bordet-Gengou	
Typhus (B. typhi abdom. (Král)	Agarrasse	2 000	2 000	1 000	7	9	7	500	300	0	5	0	300	0	3
	Eiweißrasse	2 000	2 000	2 000	6	8	10	2000	100	0	5	0	100	0	6
Paratyphus A (B. paratyphus A Date)	Agarrasse	8 000	8 000	100	10	13	11	0	0	0	0	0	0	0	0
	Bouillonrasse	2 000	1 000	0	5	4	0	100	500	0	2	0	0	0	0
	Eiweißrasse	0	0	6 500	0	0	15	6000	300	0	11	500	100	1	10
Paratyphus B (B. paratyphi B Busse)	Agarrasse	9 000	3 000	0	16	13	0	200	0	0	0	0	0	0	0
	Bouillonrasse	10 000	4 000	100	11	11	0	300	100	0	0	0	0	0	0
	Eiweißrasse	0	0	2 000	1	1	6	100	300	1	1	0	100	0	0
Gärtner (B. enteritidis Gärtner Nr. 710)	Agarrasse	6 000	0	6 000	15	13	15	3000	2000	2	13	0	8 000	4	16
	Bouillonrasse	6 000	2 000	6 000	12	8	13	1000	500	2	6	300	4 000	3	7
	Eiweißrasse	20 000	12 000	20 000	9	4	12	2000	3000	0	8	3000	16 000	1	5

Agar-, Bouillon- und Eiweißrassen (beide von niedrigem Titer) gewonnen wurden. Wir sehen, daß die Typhus-Agar und Eiweißsera (beide von niedrigem Titer) in der Komplementbindungsreaktion Gruppenreaktionen mit dem Bac. Mereschkowsky und teilweise mit Bac. Danysz geben. Auffallend ist die Tatsache, daß, während beim Bac. Mereschkowsky in der Agglutinationsreaktion mit den beiden Typhussera die Bouillonrasse und in der Komplementbildungsreaktion die Eiweißrasse desselben Bazillus stärker reagiert, beim Bac. Danysz die Eiweißrasse bei beiden Bakterien ausgesprochenere Ausschläge gibt.

Sowohl Bac. Mereschkowsky als auch Bac. Danysz geben mit Paratyphus A- und B-Sera im allgemeinen unbedeutende Reaktionen; das Paratyphus A-Eiweißserum gibt zwar mit der Agglutinationsreaktion ein deutlich positives Resultat mit der Bouillonrasse des Bac. Mereschkowsky und ebenso mit der Komplementbindungsreaktion mit den Eiweißrassen desselben Stammes, wie auch mit Bac. typhi spermophilorum und Bac. Danysz. Wie wir aber weiter sehen werden, stellt die Eiweißrasse des Bac. paratyphi A vom serologischen Standpunkte aus ein „novum" dar, und man hat kein Recht, allein auf Grund der obengenannten Ergebnisse irgendwelche allgemeinen Schlußfolgerungen zu ziehen. Sowohl der Bac. Mereschkowsky als auch der Bac. Danysz geben starke Gruppenreaktionen mit den Sera, die spezifisch für Bac. enteritidis Gärtner sind, wobei auch hier, in der Agglutinationsreaktion, die Bouillonrasse des Bac. Mereschkowsky stärker reagiert und in der Komplementbindungsreaktion die Eiweißrasse. Mit den Gärtner-Seren reagiert der Bac. Danysz unvergleichbar schärfer als der Bac. Mereschkowsky, und zwar in beiden Reaktionen als Eiweißrasse.

Auf diese Weise fand die Tatsache der serologischen Verwandtschaft des Bac. typhi abdominalis und Bac. typhy spermophilorum, die schon in einer früheren Arbeit von mir[1]) berührt war, eine feste Stütze durch Anwendung der Methodik der Kreuzimmunisierung. Dasselbe kann man auch von dem Verhalten des Bac. enteritidis Gärtner zum Bac. typhi spermophilorum sagen, den ich auf Grund der Versuche mit Danysz-Seren (die Versuche wurden im 1. Teil dieser Arbeit beschrieben) zu der Gruppe Bac. enteritidis II (Typus Gärtner) rechnete.

Wenn wir ferner die Zahlenergebnisse unserer Tab. Nr. IV analysieren, so sehen wir, daß der Bac. Mereschkowsky in serologischer Hinsicht dem Bac. typhi abdominalis näher steht als dem Bac. enteritidis Gärtner, und daß der Bac. Danysz, der in seiner Eiweißvariante vom Bac. enteritidis Gärtner sich nicht unterscheiden läßt, auf Grund seiner serologischen Verwandtschaft mit dem Bac. typhi abdominalis schon hinter dem Bac. Mereschkowsky steht. Diese nicht unwesentliche theoretische Tatsache kann meines Erachtens auch praktische Bedeutung bekommen, wenn wir uns an die Unfähigkeit des Bac. typhi spermophilorum, Trauben- und Milchzucker zu vergären, und im Zusammenhang damit an sein farbloses Wachstum auf den Endo- und Drigalski-Nährboden erinnern.

Ich erlaube mir, das Gesagte dadurch zu ergänzen, daß die starken Gruppenreaktionen der Typhussera mit Kulturen des Bac. typhi spermophilorum nicht eine Folge von Hyperimmunisierung waren, da die Typhussera ein positives Resultat mit dem Bac. Mereschkowsky vom Anfang der Immunisierung an gaben.

Es folgt nunmehr die Besprechung der Ergebnisse, die ein interessantes Verhalten, insbesondere der Bouillonrasse des Bac. Mereschkowsky zu den käuflichen agglutinierenden Typhussera aufweisen. Aus Tabelle V ersehen wir, daß die Bouillonrasse des Bac. Mereschkowsky durch agglutinierendes Typhusserum bis zu dem gleichen Titer wie die Typhuskultur und sogar auch höher agglutiniert wird.

Tabelle V.

Das untersuchte Serum:	Kultur, die untersucht wurde:					
	Bouillonrasse B. typhi abdominalis (Král)	Eiweißrasse B. typhi abdominalis (Král)	B. typhi abdominalis (R.)	B. typhi abdominalis (Leishman)	Bouillonrasse B. Mereschkowskys	Eiweißrasse B. Mereschkowskys
Typhusserum des Sächsischen Serumwerkes Titer 1:10000	16000	12000	12000	10000	10000	4000
Typhusserum des Petersburger Instituts für experimentelle Medizin	1000	<1000	—	—	4000	2000
Typhusserum des Moskauer Instituts „Immunität“	12000	12000	—	20000	20000	2000

1) Ueber die serologische Charakteristik des Bac. Mereschkowsky (Arb. d. landwirtsch. Bakteriol. Laborat. St. Petersburg. Bd. 5. Nr. 12.)

Zur Ergänzung erwähne ich noch folgende Tatsache: Es gelang mir, im Laboratoriumsvorrat von alten Agglutinationsseren ein von Blumenthal in Moskau hergestelltes Typhusserum zu finden, das bei hohem Titer (1:6000) die Bouillonrasse des Bac. Mereschkowsky agglutinierte, während es seine Agglutinationseigenschaft gegenüber Typhusbazillen völlig verloren hatte. Eine Verwandtschaft der Eiweißrasse des Bac. Mereschkowsky mit dem Bac. typhi abdominalis äußert sich zwar auch in den Agglutinationsversuchen, aber in einer weniger ausgesprochenen Form, als bei der Bouillonrasse.

Möglich ist es, daß diese Beziehungen viel schärfer in der Komplementbindungsreaktion hervortreten würden, indes mußte ich aus rein äußeren Gründen auf die Ausführung dieser Reaktion mit käuflichen Sera verzichten.

Nachdem das Verhalten des Bac. Mereschkowsky und des Bac. Danysz zu den obengenannten Sera eingehend erörtert worden ist, gehe ich zur Besprechung der Ergebnisse über, die bei Verwendung der gleichen Sera mit den Agar-, Bouillon- und Eiweißrassen der homologen Antigene und auch der verschiedenen Stämme des Typhus, Paratyphus A und B sowie des Gärtner-Bazillus gewonnen wurden. Die Ergebnisse sind in den Tabellen VI und VII dargestellt.

Tabelle VI.
Resultate der Agglutinationsreaktion.

Bezeichnung des aggl. Serums und der Rasse, mit der es hergestellt ist.		Bac. typhi abdominal.			Bac. paratyphi A			Bac. paratyphi B			Bac. enteritidis Gärtner.			Bac. typhi murium		
		Agar	Bouillon	Eiweiß	Agar	Bouillon	Eiweiß	Agar	Bouillon	Eiweiß	Agar	Bouillon	Eiweiß	Agar	Bouillon	Eiweiß
Typhus	Agar	2000	2000	1000	0	100	0	0	0	500	1 000	500	300	0	0	0
	Bouillon	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Eiweiß	2000	2000	2000	100	300	100	0	0	100	300	100	100	0	100	100
Paratyphus A	Agar	0	0	0	8000	8000	100	0	0	5000	0	0	0	500	1000	1000
	Bouillon	100	300	100	2000	1000	0	0	0	500	100	0	0	0	100	100
	Eiweiß	1000	3000	1000	0	0	6500	1 000	100	300	300	100	100	6000	6000	6000
Paratyphus B	Agar	0	0	0	0	200	3000	9 000	3000	0	0	0	0	9000	9000	9000
	Bouillon	0	0	0	0	0	2000	10 000	4000	100	0	0	0	1000	2000	2000
	Eiweiß	1000	600	600	3000	3000	0	0	0	2000	100	0	100	0	0	0
Gärtneri	Agar	3000	1000	1000	0	300	100	0	0	500	6 000	0	6 000	0	500	100
	Bouillon	2000	2000	2000	0	200	300	0	300	100	6 000	2 000	6 000	0	300	100
	Eiweiß	5000	4000	5000	0	100	300	300	100	100	20 000	12 000	20 000	0	300	300

In Tabelle Nr. VI sind die Ergebnisse der Agglutination, in Tabelle Nr. VII die der Komplementbindung dargestellt. Im einzelnen sehen wir, daß 1) die Agglutinierbarkeit und die agglutinogenen Eigenschaften der Agar- und Eiweißrassen des Bac. typhi abdominalis sich nicht wesentlich verändert haben, sowohl bei der Untersuchung mit homologen, als auch mit heterologen Sera; daß 2) die Agglutinierbarkeit und die agglutinogenen Eigenschaften der Agar- und Bouillonrassen des Bac. paratyphi A einander sehr ähnlich sind; es fällt auf, daß, während die Agar- und Bouillon-Paratyphus A-Sera die Agar- und Bouillonrassen desselben Stammes agglutinierten, die Eiweißrasse desselben Bazillus durch die obengenannten Sera fast oder gar nicht agglu-

Tabelle VII.
Resultate der Komplementbindungsreaktion.

Bezeichnung des aggl. Serums und der Rasse, mit der es hergestellt ist.		Bac. typhi abdomin.			Bac. paratyphi A			Bac. paratyphi B			Bac. enteritidis Gärtneri			Bac. typhi murium		
		Agar	Bouillon	Eiweiß	Agar	Bouillon	Eiweiß	Agar	Bouillon	Eiweiß	Agar	Bouillon	Eiweiß	Agar	Bouillon	Eiweiß
Typhus	Agar	7	9	7	1	1	0	3	3	4	7	2	7	0	0	0
	Bouillon	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Eiweiß	6	8	10	0	1	0	3	4	3	4	4	4	0	0	0
Paratyhpus A	Agar	0	0	0	10	13	11	5	5	4	0	0	0	3	9	6
	Bouillon	0	1	0	5	4	0	0	0	7	1	1	0	0	0	0
	Eiweiß	2	1	1	0	0	16	1	2	0	1	0	1	16	6	12
Paratyphus B	Agar	0	0	0	0	3	1	16	13	0	1	0	0	3	3	0
	Bouillon	0	0	0	0	0	1	11	11	0	1	0	0	1	0	1
	Eiweiß	1	0	1	5	5	0	1	1	6	3	1	2	0	0	0
Gärtneri	Agar	15	15	15	7	3	0	0	0	2	15	13	15	2	2	2
	Bouillon	11	4	7	0	0	0	0	0	0	12	8	13	0	0	0
	Elweiß	9	5	7	0	0	0	0	0	0	9	4	12	0	0	0

tiniert wurde. Außerdem wirkte das Bouillon-Paratyphus A-Serum etwas weniger spezifisch, insofern als es andere Bakterienarten auch beeinflußte, obwohl sein Titer bedeutend niedriger war, als der des Agarserums. Ferner agglutinierten das Agar-Paratyphus A-Serum und auch das Eiweiß-Paratyphus A-Serum die Eiweißrasse des Bac. paratyphi B bei hohem Titer. Das Eiweiß-Paratyphus A-Serum agglutinierte nur die homologe Rasse, dagegen nicht die Agar- und Bouillonrasse der gleichen Bakterienart (Bac. paratyphi A), außerdem reagierte es fast in derselben Titerhöhe wie mit seinem Antigen mit allen Rassen des Bac. typhi murium, etwas weniger, aber doch deutlich mit allen Rassen des Bac. typhi abdominalis und mit der Agarrasse des Bac. paratyphi B und schließlich in geringem Grade mit den verschiedenen Rassen des Bac. enteritidis Gärtner. Bemerkenswert ist zweifellos die Feststellung, daß die Eiweiß-Paratyphus A-Rasse die Fähigkeit erworben hat, mit Agar- und•Bouillon Paratyphus B-Seren zu reagieren. Es ergibt sich somit die Tatsache, daß die Antigeneigenschaften der Eiweißrasse des Bac. paratyphi A bedeutende Veränderungen im Vergleich zu den Agar- und Bouillonrassen derselben Bakterienart (B. paratyphi A) erfahren haben. „Das Mosaik der Antigeneigenschaften"[1]) zeigte sich hier sehr deutlich bei der Eiweißrasse, da das Eiweißserum, ohne die Fähigkeit zu besitzen, die Agar- und Bouillonrasse zu agglutinieren, nur die Eiweißrasse der gleichnamigen Paratyphus A-Kultur zu beeinflussen vermochte. Dasselbe Serum agglutinierte scharf den Bac. typhi murium; wie oben erwähnt, agglutinierte es ziemlich stark auch den Bac. typhi abdominalis und teilweise den Bac. paratyphi B. Es hat also die Eiweißrasse des Bac. paratyphi A die antigenen Eigenschaften des Bac. paratyphi A eingebüßt und in dieser Hinsicht

1) Nicolle, M., Delbain, E., et Mlle Raphael, Ann. Pasteur. T. 31. 1917. p. 388.

eine gewisse Unbestimmtheit angenommen, ausgesprochen ist dagegen nunmehr eine Neigung zu dem Bac. typhi murium resp. dem Bac. paratyphi B, so daß sie vom Standpunkte der Agglutinabilität identisch mit dem Bac. paratyphi B erscheint. Die Agar- und Bouillonrassen des Bac. paratyphi B stimmen vom serologischen Standpunkte aus sehr überein; die Eiweißrasse derselben Art dagegen wich sowohl bezüglich ihrer agglutinogenen Eigenschaft als auch ihrer Agglutinabilität ab. Während das Paratyphus B-Eiweißserum sein Antigen — die Eiweiß-Paratyphus B-Rasse — stark agglutinierte, beeinflußte es gar nicht die Agar- und Bouillonrasse der gleichnamigen Art; die Agar- und Bouillonrassen des Bac. paratyphi A wurden, wie schon erwähnt, durch das obengenannte Eiweiß-Paratyphus B-Serum agglutiniert. Keine der Rassen des Bac. typhi murium wurde agglutiniert. Ueber die Agglutinabilität der Eiweißrasse des Bac. paratyphi B mit den Agar- und Bouillon-Paratyphus A-Sera habe ich bereits oben berichtet. Somit kann festgestellt werden, daß die Eiweißrasse des Bac. paratyphi B hinsichtlich ihrer Antigeneigenschaften im weiten Sinne des Wortes zur Art des Bac. paratyphi A gehört. 4) Die agglutinogenen und Agglutinabilitätseigenschaften aller Rassen des Bac. enteritidis Gärtner waren ungefähr übereinstimmend.

In der Tabelle Nr. VII, die die Ergebnisse der analogen Untersuchungen mit Hilfe der Komplementbindung darstellt, treten in ihren Grundzügen dieselben Tatsachen hervor, die bereits mit Hilfe der Agglutination konstatiert wurden, und zwar:

1) die Antigeneigenschaften des Bac. typhi abdominalis erwiesen sich fast gleich denen der Agar- und Eiweißrassen derselben Art; 2) die Antigeneigenschaften der verschiedenen Rassen des Bac. paratyphi A erfuhren bedeutende Veränderungen. Das Bouillon-Paratyphus A-Serum unterscheidet sich von dem gleichnamigen Agarserum durch den Mangel an Fähigkeit, Gruppenreaktionen mit den Agar- und Bouillonrassen des Bac. paratyphi B und des Bac. enteritidis Gärtner zu geben; es reagiert scharf mit der Eiweißrasse des Bac. paratyphi B und reagiert nicht mit derselben Rasse des Bac. paratyphi A. Das Eiweiß-Paratyphus A-Serum aber, das mit der homologen Rasse des Bac. paratyphi A und mit allen Rassen des Bac. typhi murium scharf reagiert, gibt fast keine Komplementbindung mit den Agar- und Bouillonrassen des homologen Bazillus. Wir sehen somit, daß trotz der Abweichung der Eiweißrasse von der Agar- und Bouillonrasse, sie doch mit der Paratyphus A-Gruppe verbunden ist, dank ihrer Fähigkeit, mit dem Agar-Paratyphus A-Serum zu reagieren. Es kam auch eine Verschiebung ihrer Antigeneigenschaften nach der Richtung des Bac. paratyphi B zustande, doch äußerte sich diese Verschiebung nur in der Eigenschaft des Eiweiß-Paratyphus A-Serums, mit dem Bac. typhi murium und nicht mit dem Bac. paratyphi B, bei dem die Gruppenreaktion sehr undeutlich ausgesprochen ist, zu reagieren; es nimmt also auf Grund der Ergebnisse der Komplementbindungsreaktion die Eiweißrasse des Bac. paratyphi A bezüglich ihrer Antigeneigenschaften eine Mittelstellung zwischen dem Bac. paratyphi A und dem Bac. paratyphi B ein. — 3) Die Antigeneigenschaften der Agarbouillon- und Eiweißrassen des Bac. paratyphi B haben sich scharf in dem Sinne verändert, daß die Agar- und Bouillon-Paratyphus B-Sera bei der

Kreuzreaktion mit den homologen Antigenen fast identisch reagierten; mit der Eiweißrasse des Bac. paratyphi B gab jedoch weder das eine noch das andere Serum eine Komplementbindungsreaktion. Das Eiweiß-Paratyphus B-Serum aber, das mit der Eiweißrasse scharf reagierte, gab keine Bindung mit den Agar- und Bouillonrassen der homologen Art, wohl aber eine positive Reaktion mit den Agar- und Bouillonrassen des Bac. paratyphi A, d. h. die Eiweißrasse des Bac. paratyphi B gehört hinsichtlich ihrer Antigeneigenschaften, wie sie die Komplementbindungsreaktion aufdeckte, zu der Art des Bac. paratyphi A. — 4) Die Antigeneigenschaften aller Rassen des Bac. enteritidis Gärtner waren annähernd gleich. — Zum Schluß sei noch bemerkt, daß unter dem Einfluß der Kultivierung auf dem Eiweißdekokt sich beim Bac. paratyphi A und B die Eigenschaft entwickelte, Gruppenreaktionen mit dem Bac. typhi abdominalis und Bac. enteritidis Gärtner zu geben.

Wir sehen also, daß etwa 500 ununterbrochene Passagen in 10proz. Eiweißdekokt genügen, um den Bac. paratyphi B in eine Modifikation überzuführen, die in ihren Antigeneigenschaften, die durch die Agglutinations- und Komplementbindungsreaktionen (nach Bordet-Gengou) ermittelt werden, mit dem B. paratyphi A fast übereinstimmte; etwa 700 Passagen ceteris paribus des Bac. paratyphi A gaben die Möglichkeit, vom Bac. paratyphi A ein „antigenes novum" abzuspalten, das zwischen dem Paratyphus A und dem Paratyphus B steht.

Wie verhalten sich nun die Eiweißrassen des Bac. paratyphi A (Date) und des Bac. paratyphi B (Busse) zu agglutinierenden Sera, wie sie im Handel erhältlich sind? Hierbei stellte sich heraus, daß die Paratyphus A- und B-Sera (der Sächsischen Serumwerke), während sie die gleichnamigen Agarrassen und auch andere zur Kontrolle herangezogenen Paratyphus A- und B-Kulturen agglutinierten, die homologen Eiweißrassen gar nicht agglutinierten. Der Titer des Paratyphus A-Serums war 1:22000, und der des Paratyphus B-Serums 1:8000. Als ich das Paratyphus B-Serum, das im Petersburger Institut für experimentelle Medizin hergestellt war, einige Zeit darauf mit allen Rassen des B. paratyphi A und B untersuchte, erzielte ich einen positiven Erfolg für die Agar- und Bouillonrassen des Bac. paratyphi B (Agglutination bis zum Titer 1:15000), sowie für die Eiweißrasse des Bac. paratyphi A (1:11000), während die Eiweißrasse des Bac. paratyphi B nur in einer Serumverdünnung 1:1000 agglutiniert wurde; in der Verdünnung 1:1000 wurden indes auch die Agar- und Bouillonrassen des Bac. paratyphi A agglutiniert. Diese Versuche haben somit unsere zuvor gemachten Angaben bestätigt. Auf jeden Fall geben mir die gewonnenen Ergebnisse das Recht, zu behaupten, daß keine scharfe Grenze zwischen den Arten des Bac. paratyphi A und B vorhanden ist, und daß also die Möglichkeit des Ueberganges der einen Art in die andere besteht — eine Tatsache, die unter den Bedingungen eines strengen Experimentes, das in vitro geführt wurde, gewonnen wurde; außerdem wiesen wir bei der Analyse unserer Ergebnisse darauf hin, daß die Eiweiß-Paratyphus A-Kultur hinsichtlich ihrer Antigeneigenschaften eine mittlere Stellung zwischen den Arten des Bac. paratyphi A und B einnimmt, was die Annahme nahe legt, daß die Veränderungen in ihren Antigeneigenschaften mit der Verschiebung nach der Seite des Bac.

paratyphi B nach und nach zustande gekommen sind. Auf diese Weise erklärt sich auch der allmähliche Verlauf des gezeigten Vorganges. Die Untersuchung der erwähnten Veränderlichkeit in verschiedenen Etappen würde zweifellos ein großes Interesse darbieten; leider war die Durchführung derartiger Versuche unter den bestehenden Arbeitsbedingungen unmöglich. Ich hoffe, künftig diese Lücke ausfüllen zu können.

Das Ergebnis meiner Untersuchungen stellt vom theoretischen Standpunkte aus nichts Unerwartetes dar. Wenn wir uns erinnern an die Untersuchungen und Beobachtungen von C. Sobernheim und E. Seligmann über den Enteritiserreger[1]), an diejenigen von Seligmann über die Dysenteriebazillen[2]), und an die von letzterem ausgesprochene Vermutung, daß typische Shiga-Kruse-Bazillen durch den B. Flexner aus Bact. coli sich zu entwickeln vermögen, wenn wir an die Arbeit von Nicolle und seinen Mitarbeitern mit der Schlußfolgerung über das „Mosaik der Antigeneigenschaften"[1]) der paratyphösen und typhösen Bakterien denken, an die Beobachtungen Greigs[2]) über den Uebergang eines choleraartigen Wasservibrios in den Choleravibrio, an die zahlreichen Beobachtungen Eisenbergs, und endlich an die oben erwähnte Arbeit K. Baerthleins[1]), so kann man sich kaum wundern, wenn Köhlisch die Möglichkeit in Erwägung zieht, daß das Bact. coli commune im Darm in den B. typhi abdominalis überzugehen imstande ist[3]). Wenn wir auch mit unseren Schlußfolgerungen nicht so weit gehen wollen, so finden sich in der Literatur doch genügend Einzelheiten, die uns zur Annahme der Möglichkeit von Schwankungen und sogar von Uebergängen im Bereiche der Arten von verschiedenen Bakterienstämmen berechtigen. Die ausgesprochenen Gruppenreaktionen, die fast unbemerkbaren Uebergänge innerhalb der Arten, die verschiedenen Eigenschaften der Bakterienkulturen ein und derselben Art, je nach ihrer Isolierung während verschiedener Epidemien oder in verschiedenen Perioden einer und derselben Epidemie oder aus verschiedenen Organen eines und desselben Objektes, aber in verschiedenen Krankheitsperioden, und schließlich die nicht seltene Möglichkeit des Kultivierens gleichartiger Kulturen, die aus einem und demselben Objekte gleichzeitig gewonnen wurden und sich doch voneinander unterschieden, all diese Tatsachen sprechen für die von mir aufgestellte Behauptung. Wenn wir uns an die Ergebnisse meiner, wenn auch nicht sehr zahlreichen Tatsachen halten, so ergibt sich ein Material, das die Annahme, daß eine Art der Paratyphusbakterien in eine andere überzugehen vermag, ohne weiteres zuläßt.

Zusammenfassung.

1) Die Ergebnisse der mit Danysz- und Gärtner-Sera durchgeführten Agglutinations- und Komplementbindungsversuche sprechen für eine serologische Gruppengemeinschaft von Bac. Danysz, Bac. typhi spermophilorum (Bac. Mereschkowsky), Bac. Issa-

1) loc. citato.
2) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 79. H. 2. S. 71.
3) The indian Journ. of. med. research 1915. Vol. 3. Nr. 2. p. 259.
4) Siehe Salus. Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 80. H. 4. S. 196.

tschenko und Bac. enteritidis Gärtner. Die serologische Zugehörigkeit des Bac. typhi spermophilorum zur Gruppe Bac. enteritidis II steht somit in einem gewissen Gegensatz zu seinen sonstigen biologischen Eigenschaften. — 2) Die bei Verwendung von Typhusimmunsera (verschiedener Herkunft) zutage tretende Gruppenreaktion des Bac. typhi spermophilorum hat speziell bei Mitberücksichtigung seiner Unfähigkeit, den Trauben- und Milchzucker zu vergären, nicht nur ein praktisches differentialdiagnostisches Interesse, sondern spricht dafür, daß der Bac. Mereschkowsky dem Bac. typhi abdominalis näher steht, als der Bac. enteritidis Gärtner. — 3) Bac. typhi spermophilorum nimmt somit eine serologische Mittelstellung ein zwischen Bac. typhi abdominalis und Bac. enteritidis Gärtner, wobei das spezifische Gärungsverhalten Trauben- und Milchzucker gegenüber eine unmittelbare Annäherung an den Eberthschen Bac., die artspezifische Mauspathogenität hingegen seine Nähe zum Gärtner-Stamm veranschaulichen. — 4) Die serologische Gruppenreaktion des Bac. typhi spermophilorum äußert sich im Agglutinationsversuch am ausgesprochensten bei Verwendung von Bouillonrassen. Im Komplementbindungsversuch hingegen reagieren am schärfsten die in Eiweißdekokt kultivierten „Eiweißrassen“. — 5) Eine serologische Differenzierung von Danysz- und Gärtner-Stämmen gelingt nicht, selbst bei Heranziehung der kreuzweisen Immunisierung. — 6) Die antigenen Eigenschaften von Danysz-Stämmen (sowohl im Sinne der Antikörperbildung als im Antikörperbindungsversuch) treten bei den Eiweißrassen schärfer hervor als bei den Bouillonrassen. — 7) Im allgemeinen reagieren Danysz-Bouillonrassen ausgesprochener mit Immunsera, die mit Bouillonkulturen hergestellt waren, und Eiweißrassen mit entsprechenden „Eiweißimmunsera“. Solches Verhalten kommt besonders im Komplementbindungsversuch zur Geltung. — 8) Drei Danysz-Immunsera, die mit Eiweißrassen hergestellt waren, reagierten in ausgesprochener Weise mit Bac. typhi spermophilorum. Es ließ sich dabei weder durch Berücksichtigung der quantitativen Verhältnisse der Komplementbindungs- und Agglutinationsversuche, noch durch den Absättigungsversuch nach Castellani eine serologische Differenzierung der Stämme durchführen. — 9) Verschiedene Danysz-Immunsera geben im Agglutinations- und Komplementbindungsversuch positive Ausschläge mit Paratyphus A- und B-Stämmen, wobei die Titerhöhe bis an spezifische (für homologe Danysz-Stämme) Grenzen reicht. — 10) Ständige, längere Zeit durchgeführte Bouillonpassagen setzen bei Bac. enteritidis Gärtner im Gegensatz zu Bac. typhi abdominalis seine Agglutinabilität und seine Komplementbindungsfähigkeit herab. — 11) Vergleichende Untersuchungen über die antikörperbildenden Eigenschaften von „Bouillon“- und „Eiweißrassen“ der Typhus- und Gärtner-Stämme haben er-

wiesen, daß die „Eiweißrassen", speziell bei Typhusstämmen, wirksamer sind als die Bouillonrassen. — 12) Unter Einfluß von ununterbrochenen Passagen in Eiweißdekokt erleiden Paratyphus A- und B-Stämme wesentliche Aenderungen in ihren antikörperbildenden und antikörperbindenden Qualitäten: a) Die „Eiweißrasse" des Bac. paratyphi A nähert sich bezüglich ihrer antikörperbildenden Eigenschaften dem Bac. paratyphi B, ohne indessen seine antikörperbindende Spezifität dem Paratyphus A-Serum gegenüber einzubüßen. — b) Die „Eiweißrasse" des Bac. paratyphi B hingegen weist nicht nur eine fast völlige Uebereinstimmung mit den antikörperbildenden Qualitäten des Paratyphus A-Stammes auf, sondern verliert auch seine spezifischen antikörperbindenden Qualitäten dem Paratyphus B-Serum gegenüber.

Ueber einige Bedingungen der Darminfektion bei Nagern mit Bacillus Danysz und Mereshkowsky.

[Aus der Abteilung der landwirtschaftlichen Mikrobiologie des Staatsinstituts für experimentelle Agronomie zu Leningrad (Vorstand: Akademiker S. P. Kostytscheff).]

Von Dr. **J. R. Petroff.**

Auf Grund der Untersuchungen von R. Koch (1), Kurloff und Wagner (2), Kabrehl (3), Hamburger (4), Hansen (5), Gregersen (6) u. A. wird allgemein angenommen, daß der Magensaft dank seines Gehalts an Salzsäure bedeutende bakterizide Fähigkeit besitzt. Daher erscheint es unverständlich, daß beim Einführen der Bazillen von Danysz wie auch der von Mereshkowsky (7, 8) (B. typhi spermophilorum) graue Ratten und Mäuse eine Mortalität von 93—100 Proz. aufweisen. Zur Klärung dieser Frage habe ich auf Anregung von Herrn Dr. S. S. Mereshkowsky Versuche angestellt und in erster Linie die Wirkung von wäßrigen Salzsäurelösungen auf die genannten Bazillen nachgeprüft.

Nach Herstellung der gewünschten Salzsäurelösungen wurden dieselben 5 Min. lang bei 1 Atmosphäre Druck sterilisiert. Nachher bestimmte ich ihre Konzentration, indem ich sie mit $^1/_{10}$ Normal-Natronlauge titrierte, worauf die Lösung in eine Reihe von sterilen Reagensgläsern verteilt wurde.

In diese letztere verimpfte ich je 1 Normalöse Agar- oder Bouillonkultur der obengenannten Bazillen (die Agarkultur wurde vorher an der Wand des Reagensglases fein zerrieben). Dann wurden jeweils nach 3—5 Min. aus diesen Reagensgläsern nach energischem Durchschütteln Aussaaten auf Schrägagar oder Bouillon gemacht. Alle erwähnten Manipulationen wurden so rasch als möglich ausgeführt, um ein Abkühlen der Reagensgläser zu vermeiden.

Meine ersten Versuche stellte ich mit Agarkulturen der Bazillen von Danysz und Mereshkowsky an, die ich mit 0,1—0,065proz. Salzsäurelösung vermischte. In diesen Versuchen erhielt ich jedoch

keine eindeutigen Resultate, und zwar war in den Kontrollaussaaten, die am Anfange des Versuchs auf Agar gemacht wurden, keine oder nur sehr spärliche Entwicklung von Kolonien nachweisbar, während die Proben im weiteren Verlauf des Versuchs reichliches Wachstum zeitigten. Diese Tatsache läßt sich durch den Umstand erklären, daß durch das Konfluieren von Kolonien in den Agarkulturen sich Bakterienkonglomerate bilden, die augenscheinlich der Säure gegenüber widerstandsfähiger sind als die einzeln liegenden Bakterien. Die Anwesenheit der erwähnten Bakterienkonglomerate in der Salzsäurelösung konnte ich stets mikroskopisch nachweisen. Daher habe ich in meinen weiteren Versuchen ausschließlich Bouillonkulturen der Danysz- und Mereshkowsky-Bazillen angewandt und folgende Resultate erzielt (siehe Tabelle I).

Tabelle I.

Versuchsnummer	Konzentration der Salzsäurelösung	Lebensdauer der Bazillen in den Salzsäurelösungen in Minuten	
		B. Danysz	B. Mereshkowsky
1	0,02proz.	.	20–25
2	0,02 „	43–47	.
3	0,02 „	40–42	.
4	0,02 „	30–33	15–17
5	0,02 „	40–42	20–25
6	0,02 „	40–43	22–27
7	0,02 „	35–37	20–23
8	0,04 „	12	1–3
9	0,04 „	12	1–3
10	0,04 „	7	1–3
11	0,04 „	10	1–3
12	0,065proz.	5	1
13	0,065 „	7	1

Aus der Tabelle I ist zu ersehen, daß die Lebensfähigkeit der Danysz-Bazillen, die einer 0,02proz. starken wäßrigen Salzsäurelösung ausgesetzt waren, noch 35—40 Min. erhalten bleibt, während sie für die Mereshkowsky-Bazillen schon nach 20—25 Min. erlischt. In konzentrierteren Lösungen (0,04proz.) verlieren die Danysz-Bazillen ihre Lebensfähigkeit erst nach 10—12 Min., die Mereshkowsky-Bazillen schon nach 2—3 Min. In 0,065proz. HCl-Lösungen bleiben die Danysz-Bazillen nur 5—7 Min. lang lebensfähig. Aus diesen Angaben folgt, daß die beiden genannten Bazillenarten sehr empfindlich gegen Salzsäure sind, wobei die Mereshkowsky-Bazillen im Vergleich zu den Danysz-Bazillen noch bedeutend weniger widerstandsfähig erscheinen.

In meinen weiteren Versuchen prüfte ich die Wirkung von Salzsäurelösungen auf die Danysz- und Mereshkowsky-Bazillen in Kombination mit Pepton und Stärke, Stoffen, die im Mageninhalt vorkommen. Zu diesem Zwecke fügte ich zu den Salzsäurelösungen in der oben angegebenen Konzentration 1 Proz. Pepton Merck oder 1 Proz. lösliche Stärke hinzu und verfuhr nach Sterilisierung bei meinen Versuchen mit diesen Mischungen wie mit den reinen Salzsäurelösungen. Die Resultate dieser Versuche zeigten, daß der Zusatz von Pepton Merck und Stärke im Verhältnis von 1 : 100 zu den Salzsäurelösungen

dieser oder jener Konzentration die bakterizide Wirkung der Salzsäure auf die Danysz- und Mereshkowsky-Bazillen in keiner Weise beeinträchtigt. Die Lebensfähigkeit der Danysz-Bazillen erlischt in 0,02 Proz. starken Salzsäurelösungen mit Zusatz von Pepton nach 33—40 Min., die der Mereshkowsky-Bazillen unter gleichen Verhältnissen schon nach 19—20 Min., was den oben angeführten Daten bei der Wirkung von Salzsäure allein vollständig entspricht.

In einer Reihe weiterer Versuche setzte ich den Salzsäurelösungen Schleim zu, und zwar verwandte ich zu diesem Zweck den Schleim aus Samen der Quitte (Cydonia vulgaris Pers.). (1 g Samen wird mit 100 ccm dest. Wasser im Laufe von $^1/_2$—1 Std. unter heftigem Schütteln extrahiert.) Da in solchen Mischungen die Bazillen ungleich verteilt sein konnten, machte ich die Aussaaten nicht auf Agar, sondern nur auf Bouillon. Die Säurekonzentration in den Mischungen von Salzsäure mit Schleim wurde jedesmal durch Titration festgestellt. Außerdem habe ich zur Kontrolle auch die H'-Ionenkonzentration in diesen Mischungen mittels der Indikatorenmethode von Michaelis bestimmt und die gleichen Zahlen für P_H in den Salzsäurelösungen ohne und mit Schleimzusatz gefunden. Die Resultate dieser Versuche sind auf der Tabelle II angeführt:

Tabelle II.

Versuchs-nummer	Konzentration der Salzsäure in der 1proz. Schleimlösung	Lebensdauer der Bazillen in den Salzsäurelösungen mit Zusatz von Schleim (in Minuten)	
		B. Danysz	B. Mereshkowsky
1	0,042proz.	60	38
2	0,042 „	66	28
3	0,042 „	60	29
4	0,4 „	10	.
5	0,4 „	10	.
6	0,4 „	12	.

Aus dieser Tabelle ist zu ersehen, daß in Salzsäurelösungen, denen Schleim beigemengt war, die Lebensfähigkeit der Danysz-Bazillen 12 Min. lang erhalten blieb, obwohl die Konzentration der Lösungen bis auf 0,4 anstieg. In schwachen Lösungen, wie z. B. bei 0,042 Salzsäure mit Zusatz von Schleim, wiesen die Danysz- und Mereshkowsky-Bazillen eine bedeutend längere Lebensfähigkeit auf als in den reinen Salzsäurelösungen von entsprechender Konzentration.

Auf Grund dieser Versuche läßt sich der Schluß ziehen, daß der Zusatz von Schleim zu den Salzsäurelösungen deren bakterizide Wirkung bedeutend herabsetzt, was augenscheinlich darauf zurückzuführen ist, daß der Schleim die Bazillen umhüllt und sie dadurch vor der schädlichen Wirkung der Säure bewahrt.

Die somit nachgewiesene Bedeutung von Schleim, der die Bakterien vor der Abtötung durch Salzsäure schützt, kann wahrscheinlich auch dem Magenschleime zugeschrieben werden. Von diesem Standpunkte aus gewinnt die pathologisch gesteigerte Schleimsekretion im Magen eine große Bedeutung für das Zustandekommen der Darminfektion.

In weiteren Versuchen habe ich, um die Verhältnisse im Rattenorganismus nachzuprüfen, die Säurekonzentration des Mageninhalts und die Dauer des Verweilens der Speisen im Magen bei Ratten bestimmt.

Ich habe gerade diese Nager gewählt, weil sie die größten Tiere sind, die sich mit Danysz-Bazillen infizieren lassen. In einem Fall versuchte ich, reinen Magensaft bei der Ratte zu gewinnen. Zu diesem Zweck injizierte ich subkutan der hungernden Ratte 5 ccm Alkohol in Verdünnung von 1:10, was nach den Beobachtungen von J. P. Pawlow die Sekretion des Magensaftes bei Hunden steigert. 20 Min. nach der Injektion wurde die Ratte getötet, und es erwies sich, daß ungeachtet der weit zurückliegenden letzten Nahrungsaufnahme (20 Std.) im Magen noch Roggenkörner vorhanden waren. Somit konnte auf diese Weise kein reiner Magensaft gewonnen werden. Angesichts eines so langen Verweilens von Speiseresten im Magen der Ratten fütterte ich die übrigen Ratten im Laufe von 2 Tagen ausschließlich mit gekochtem Fleisch, welches bekanntlich rascher verdaut wird und schneller den Magendarmkanal passiert als die pflanzlichen Stoffe. Am Versuchstage (10—15 Std. nach der letzten Nahrungsaufnahme) gab ich den Ratten einen Teig aus Roggenmehl, wie dies Mereshkowsky für die Infektion von Nagern mit Kulturen der Danysz-Bazillen empfiehlt, und vermerkte den Moment, in dem die Ratten diesen Teig angingen. Dann, in Abständen von 45 Min. bis zu 3 Std. wurden die Versuchstiere getötet, der ganze Mageninhalt gesammelt und nach Filtration mit $1/10$ Natronlauge titriert (Indikatoren: Phenolphtalein und Dimethylamidoasobenzol). Bei 2 Ratten habe ich auch die H-Ionenkonzentration im Magengehalte 45 Min. und 1 Std. nach der Fütterung mit Roggenmehlteig bestimmt und die Zahlen pH = 4,9 und 6,2 gefunden (Indikatorenmethode von Michaelis).

Aus diesen Versuchen erwies sich, daß im Mageninhalt von Ratten, die mit Roggenmehlteig gefüttert waren, keine freie Salzsäure enthalten ist, wobei der Gesamtsäuregehalt zwischen 0,35—0,24 Proz. schwankt. Nur in 1 Versuch, in welchem gleichzeitig verdünnter Alkohol in die Bauchhöhle eingespritzt wurde, konnten 0,14 Proz. freie Salzsäure bei einer Gesamtazidität von 0,35 Proz. nachgewiesen werden. Das Fehlen der freien Salzsäure im Magen von Ratten, die nach der Methode von Mereshkowsky infiziert werden, bildet einen gewissen Vorteil dieser Methode, weil dabei ein wichtiger Faktor ausgeschlossen wird, der zum Abtöten der einverleibten Bakterien führen könnte.

Außer der Säurekonzentration des Mageninhalts spielt in der Frage der Infektionsmöglichkeit der Tiere durch die Nahrungsaufnahhme die Dauer des Verweilens des Speisebreis im Magen eine große Rolle.

Zur Klärung dieser Frage habe ich folgende Versuche angestellt: Die Ratten wurden im Laufe von 2 Tagen vor dem Versuch ausschließlich mit Fleisch gefüttert, dann hungerten sie während 10—15 Std. und schließlich erhielten sie den Roggenmehlteig, dem zu Pulver verriebene, getrocknete Schwarzbeeren oder Karmin beigemengt waren. Ich vermerkte den Moment der 1. Nahrungsaufnahme, tötete die Tiere in verschiedenen Zeitabständen (von 5 Min. bis zu 3 Std.) und untersuchte zuerst makroskopisch den Darm von außen. Darauf wurde der Darm eröffnet, jedesmal vom analen Ende beginnend, um die Uebertragung gefärbter Speisereste in entferntere Darmabschnitte zu vermeiden. In manchen Fällen untersuchte ich den Darminhalt auch noch mikroskopisch, um die kleinsten Spuren des Farbstoffs zu entdecken. Aus diesen Versuchen erwies sich, daß der Roggenmehlteig sehr schnell aus dem Magen in den Zwölffingerdarm gelangt. Schon 5—10 Min. nach der Nahrungsaufnahme konnte der Speisebrei in den oberen Abschnitten des Darmes nachgewiesen werden. Nach 30 Min. sind fast die gesamten Dünndärme von der gefärbten Masse angefüllt und nach 2—3 Std. erreicht sie beinahe den Mastdarm.

Um die Zeit des Uebertritts des Speisebreis aus dem Magen in den Darm genauer zu bestimmen, habe ich noch die 2 folgenden Versuche angestellt: Die Ratten wurden im Laufe von 2 Tagen ausschließlich mit gekochtem Fleisch gefüttert und die letzten 12 Std. vor dem Versuchsanfang ganz ohne Futter gelassen. Dann wurde bei diesen Tieren in leichter Chloroformnarkose eine Fistel am Zwölffingerdarm angelegt. Zu diesem Zweck eröffnete ich durch einen Schnitt in der Linea alba die Bauchhöhle und unterband 4—5 cm unterhalb des Pylorus den Zwölffingerdarm. Oberhalb der Ligatur machte ich einen Längsschnitt am Darm, nähte die Wundränder des Darms an die Ränder der Bauchwandwunde und die durch diese Naht nicht gefaßten Teile der Bauchwandwunde vernähte ich miteinander.

Versuch Nr. 1. 15 Min. nach Beendigung der Operation erwachte die Ratte aus der Narkose und bekam Wasser zu trinken. 12 Min. nach dem 1. Schluck begann das Wasser aus der Fistel zu träufeln und lief die ganze Zeit, während die Ratte trank. Darauf erhielt das Tier den mit Karmin gefärbten Roggenmehlteig. 15 Min. nachher konnten bei der mikroskopischen Untersuchung des Darminhalts,

welcher mit Hilfe eines Wattebausches aus der Fistel entnommen wurde, Karminkörnchen nachgewiesen werden.

Versuch Nr. 2. 10 Min. nach der Operation erwachte die Ratte und trank mit Gier das ihr gereichte Wasser. 5—7 Min. nach dem 1. Schluck fing das Wasser an aus der Fistel zu träufeln und lief ununterbrochen während die Ratte trank. Die Wundränder und die Fistel wurden mit einem Wattebausch abgetrocknet, worauf die Ratte den mit Karmin gefärbten Roggenmehlteig erhielt. 15 Min. nach der Nahrungsaufnahme konnten bei der mikroskopischen Untersuchung des Fistelinhalts, der durch einen Wattebausch aufgefangen wurde, Karminspuren nachgewiesen werden.

Aus diesen Versuchen ist zu ersehen, daß bei grauen Ratten das Wasser aus dem Magen 7—12 Min. nach dem 1. Schluck im Zwölffingerdarm erscheint, der Roggenmehlteig nach 15—20 Min.

Zusammenfassung.

1) Die Danysz- wie auch die Mereshkowsky-Bazillen sind der Salzsäure gegenüber äußerst empfindlich. — 2) Die bakterizide Wirkund der Salzsäure auf diese Bazillen wird nicht durch Zusatz von Pepton Merck oder Stärke im Verhältnis von 1:100 herabgesetzt. — 3) Der Zusatz von 1 Proz. Schleim zu den Salzsäurelösungen setzt aber die bakterizide Wirkung der Salzsäure bedeutend herab. Die Lebensfähigkeit beider genannten Bakterienarten bleibt in Salzsäurelösungen, denen Schleim beigemengt ist, 5—10mal länger erhalten, als in reinen wäßrigen Salzsäurelösungen derselben Konzentration. — 4) Die bakterizide Wirkung der Salzsäure auf Agarkulturen der Danysz- und Mereshkowsky-Bazillen, in welchen die Bazillen zum Teil zu Haufen geballt sind, ist bedeutend schwächer, als die auf einzeln liegende Bazillen. — 5) Freie Salzsäure konnte im Mageninhalte der grauen Ratten, die Roggenmehlteig erhalten hatten, nicht nachgewiesen werden. — 6) Bei Ratten gelangt der Roggenmehlteig schon nach 15—20 Min. nach seiner Aufnahme aus dem Magen in den Zwölffingerdarm; für Wasser war nur eine Zeit von 7—12 Min. erforderlich. — 7) Das Fehlen freier Salzsäure im Mageninhalt und der rasche Uebertritt des Speisebreies aus dem Magen in den Darm sind wohl die Hauptfaktoren, die die hohe Mortalität der grauen Ratten bei der Infektion mit den Danysz- und Mereshkowsky-Bazillen bedingen.

Literatur.

1) R. Koch, Berl. klin. Woch. Bd. 31. 1884. S. 475; Bd. 32. S. 493. — 2) Kurloff u. Wagner, Centralbl. f. Bakt. Bd. 7. 1889. S. 448. — 3) Kabrehl, Arch. f. Hyg. Bd. 10. 1890. S. 382. — 4) Hamburger, Centralbl. f. klin. Med. Bd. 11. 1890. S. 425. — Hansen, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 62. 1912. S. 89. — 6) Gregersen, Ibid. Abt. I. Orig. Bd. 77. 1918. H. 2—4. — 7) Mereshkowsky, Ibid. Abt. I. Orig. Bd. 51 u. 52. 1909. S. 1. — 8) Ders., Arb. d. landwirtschaftl.-bakt. Laborat. Petersburg. Bd. 5. 1912. Nr. 19.

Nachdruck verboten.

Gewebskulturen als Methode zum Studium des Vakzinevirus [1]).

[Aus der Serologischen Abteilung des Bakteriologischen Instituts zu Kiew (Vorstand: Prof. M. P. Nestschadimenko).]

Von Dr. **I. W. Hach,** Assistent am Institut.

Mit 1 Abbildung im Text.

Bei der Anwendung der gewöhnlichen bakteriologischen Methoden ist es bisher noch nicht gelungen, viele wichtige Fragen der Pockenlehre, so z. B. über die Biologie des unbekannten Erregers, seine Züchtung, über die Immunität bei dieser Erkrankung u. dgl. m. mit genügender Sicherheit zu lösen.

Immer noch unklar bleibt die Frage über die Beziehungen des unbekannten Erregers zu den typischen morphologischen Befunden von Prowazek, Volpino, Casagrandi, Paschen u. a. Ebenso kann die Frage über die Möglichkeit, mit Zuhilfenahme der gewöhnlichen bakteriologischen Technik eine Reinkultur des Virus zu erhalten, trotz der Arbeiten von Pröscher, Fornet, Volpino, Plotz u. a., noch nicht als genügend geklärt gelten. Schließlich bestehen auch hinsichtlich des Entstehungsmechanismus der Immunität bei Pocken und ihres Wesens noch bedeutende Meinungsverschiedenheiten (vgl. z. B. Prowazek u. Yamamoto, sowie Sato).

Dies ist wohl ein Zeichen dafür, daß die in der Bakteriologie gewöhnlich gebrauchten Methoden sich in diesem Falle, auch in den Händen sehr erfahrener Forscher, als unzulänglich erwiesen haben. Darum dürfte es sehr wünschenswert sein, zu versuchen, der Erforschung der Variolavakzine auf andere Weise näher zu kommen.

Es schien mir, daß der nach dem Gedanken von Krontowski von uns beiden beim Studium des Fleckfiebers betretene Weg in einer allmählichen systematischen Erforschung der biologischen Eigenschaften des Virus, ohne daß die festgestellten Tatsachen sofort mit bestimmten morphologischen Befunden in Zusammenhang gebracht zu werden brauchen, besteht (vgl. Rocha-Lima, Olitsky), welcher auch in diesem Falle vielleicht Erfolg versprechen könnte.

Als Grundmethodik wurde von uns das Kultivieren von Gewebe in vitro angewendet, welche Methode uns schon manche interessante Angaben über das Fleckfiebervirus geliefert hat.

Soweit mir bekannt, gibt es zurzeit über die Brauchbarkeit der Gewebskulturmethode zum Studium der Variolavakzine bloß die Arbeiten von Steinhardt (Harde) und ihren Mitarbeitern Israeli und Lambert und diejenige von Gins (2). Steinhardt, Israeli und Lambert und Steinhardt und Lambert benutzten die Explantationsmethode zwecks Kultivierung des Vakzinevirus und sind der Ueberzeugung, daß es ihnen gelungen sei, auf diese Weise eine Kultur des Virus zu bekommen und sie über 3 Generationen im Laufe von 34 Tagen durchzuführen. Mir scheint es aber, daß die Tatsachen, die zu solchen Schlüssen Anlaß gegeben haben, abgesehen davon, daß sie an und für sich nicht durchaus überzeugend sind, noch besonders anfecht-

1) Vorgetragen bei der IV. Allukrainischen Tagung der Bakteriologen, Epidemiologen und Sanitärärzte zu Kiew, 17.—21. April 1924.

bar in Anbetracht der unvollkommenen Technik sind, mit der gearbeitet wurde.

Die Technik in den Explantationsversuchen von Steinhardt und ihrer Mitarbeiter Israeli und Lambert bestand darin, daß Stückchen normaler Organe (in den Grundversuchen Stückchen normaler und — soweit man nach den angeführten Arbeiten urteilen kann — nicht steriler Hornhaut) in vitro kultiviert wurden, wobei sie, zwecks Infizierung mit dem Vakzinevirus vorher eine gewisse Zeit in die von Glyzerin und Karbolsäure freie, aber in der Regel durch banale Bakterien verunreinigte, gewöhnliche käufliche Impflymphe eingetaucht wurden. Eine solche Technik muß natürlich als höchst unvollkommen bezeichnet werden. Als einzige Methode zur Virulenzprüfung der Explantate und deren qualitative Bewertung wurde von den Autoren die Impfung auf die Haut von Kaninchen nach Calmette u. Guérin gebraucht, was zwar sehr demonstrative Resultate ergibt, aber an und für sich ohne gleichzeitige Impfung des betreffenden Materials auf die Cornea mit nachfolgendem Nachweis von Guarnierischen Körperchen nicht immer beweisend ist [vgl. z. B. Gins (1)], und in diesem Falle im Zusammenhang mit den erwähnten Defekten der Explantationsmethodik, leicht zu irrigen Schlüssen Veranlassung geben konnte. Ob tatsächlich eine Kultur des Virus, unabhängig von der angewandten Methodik, erhalten wurde, bleibt zweifelhaft, da nach den Angaben von Steinhard u. Grund das Vakzinevirus bei den Kultivierungsversuchen mittels der gewöhnlichen bakteriologischen Technik manchmal die Fähigkeit, bei 33° am Leben zu bleiben und seine Virulenz in der 3. Subkultur, 8 Wochen nach Beginn des Versuchs zu behalten, besitzt.

Meines Erachtens kann aus den Versuchen von Steinhardt, Israeli und Lambert nur gefolgert werden, daß unter den erwähnten Bedingungen das Vakzinevirus einige Wochen lang am Leben bleiben kann, ohne seine Virulenz zu verlieren. Diese Tatsache ist an und für sich zweifellos von Interesse und kann ebenso wie andere derartige Tatsachen zur biologischen Charakteristik des Virus dienen. Jedenfalls kann aber die Explantationsmethode in der Weise, wie sie von den genannten Autoren gebraucht wurde, zur Lösung der sehr komplizierten Probleme der Variola-Vakzineforschung nicht angewendet werden. Dabei ist das Endresultat zweifelsohne von einer ganzen Reihe näher nicht abschätzbarer Faktoren (variierende Virulenz verschiedener Proben der käuflichen Impflymphe, verschiedene Adsorptionsfähigkeit der Gewebe dem Vakzinevirus gegenüber, Einfluß der qualitativ und quantitativ verschiedener Begleitbakterien) beeinflußt.

Harde (Steinhardt) explantierte die Hodenstückchen, welche auf übliche Weise (s. oben) mit Vakzinevirus infiziert wurden.

Gins (2) verwendete die Kultivierung von virulenten Kaninchenhaut- und Hornhautstückchen; zwecks Befreiung der Hornhautstückchen von bakteriellen Verunreinigungen wurde die Hornhaut mit reichlichen Mengen von Ringerscher Lösung gewaschen. Die letzte Methode ergab erfolgreiche Resultate nur in einem Teil der Fälle, im anderen blieb die Hornhaut durch banale Bakterien verunreinigt. Die von banalen Bakterien freien Hornhautstückchen bewahrten ihre volle Virulenz bei 30°—31° 7 Tage lang; nach 11 Tagen war diese fast gänzlich verloren. Das Kultivieren von Hautstückchen ergab „ungünstige Resultate".

Die Methodik von Gins stellt im Vergleich zu derjenigen von den obenerwähnten Autoren den Vorteil, daß sie ohne Verwendung von gewöhnlicher Impflymphe zu arbeiten, erlaubt — ein zweifelloser Nachteil dagegen ist aber, daß man in jedem einzelnen Fall nicht sicher sein kann, ob bakterielle Verunreinigungen des explantierten Stückchen doch nicht vorliegen.

Meines Erachtens nach kann die Gewebskulturmethode, auch in der Form, wie sie von Gins geübt wurde, zum Zwecke einer gründlichen Variolavakzineforschung nicht angewendet werden. Darum versuchte ich solche Methodik auszuarbeiten, welche ohne die obenerwähnten Nachteile zu besitzen, mit genügender Sicherheit zum genannten Zwecke benutzt werden könnte.

Um eine sichere Lösung der Frage zu erzielen, hielt ich es für unbedingt notwendig, bei den Explantationsversuchen solche Organe oder Gewebe zu verwenden, welche 1. schon im Körper des infizierten Tieres genügende und nach Möglichkeit immer ungefähr gleiche Mengen des spezifischen Virus enthalten und 2. von banalen bakteriellen Verunreinigung absolut frei sind.

Erst dann könnte man erhoffen, daß solche Bedingungen geschaffen werden, die in genügendem Maße unserer Kontrolle unterliegen.

Um diese Bedingungen zu erfüllen, habe ich für meine Versuche von Verunreinigungen mit von banalen Mikroben freie Organe von durch Einimpfung in die Hoden nach Noguchi mit reinem Passagevakzinevirus infizierten Kaninchen verwendet.

Als Ausgangsmaterial zur Infizierung der Kaninchen habe ich einen der Impfstämme des Bakteriologischen Institutes zu Kiew (Stamm „R 2") nach vorheriger Befreiung von Begleitmikroben mittels einer von mir angewendeten Modifikation der Aethermethode — Ueberschichtung des mit physiologischer Kochsalzlösung verriebenen Rohstoffes mit Aether[1]) — gebraucht. Als Folge der Impfung gelang es, beim Kaninchen eine zweifellose Orchitis zu erzielen. Durch weitere solche Impfungen wurde dann das Virus durch 45 Generationen durchgeführt, wobei die Spezifität der hervorgerufenen Orchitis (abgesehen von absolut negativem Resultat der Aussaat auf gewöhnliche bakteriologische Nährböden) durch erfolgreiche Impfung auf die Haut von Kälbern und auf die Haut und Hornhaut von Kaninchen, sowie durch typische positive Resultate der Vakzination und Revakzination beim Menschen bewiesen wurde. Im Laufe der durchgeführten Passagen zeigte sich eine bedeutende Virulenzsteigerung, wie das Zugrundegehen an generalisierter Infektion eines großen Teiles der (besonders mit späteren Generationen meines Stammes geimpften) Kaninchen bewiesen haben. In den inneren Organen und im Gehirne von auf der Höhe der Erkrankung befindlichen Tieren gelang es mir stets, die Anwesenheit vom Vakzinevirus nachzuweisen. Dabei haben in allen untersuchten Fällen die Einimpfungen von Milzstückchen besonders demonstrative Resultate ergeben[2]).

Als Versuchsmaterial dienten mir die das Vakzinevirus enthaltenden Hoden und die Milz von Kaninchen, welche durch das Passagevirus der 11.—39. Generationen infiziert wurden und sich auf der Höhe der Erkrankung befanden, also 5—6 Tage nach der Impfung.

Aus diesen Organen wurden in Gabritschewski-Schalen Gewebskulturen in einem Medium aus Ringerscher Lösung und Blutplasma vom normalen Kaninchen angelegt und für 5—12 Tage in einen Brutschrank bei 37—38° gestellt. In 2 Versuchsserien (5 u. 7) wurde auf Grund der Angabe von Steinhardt und Lambert über den günstigen Einfluß, welchen die Anwesenheit von gut wachsendem Gewebe auf das explantierte Virus ausübte, einer Anzahl Explantate dem Stückchen von virulenten Hoden noch ein solches von Milz oder Niere von neugeborenen Kaninchen hinzugefügt. Die explantierten Milzstückchen ergaben in der Regel ein gutes Wachstum, so daß am 3. Wachstumstage an der Peripherie des Stückchens eine breite Wachstumszone aus teils hypertrophierten wandernden Elementen (Lymphozyten verschiedener Größe und retikuläre Zellen) und einer großen Anzahl junger Fibroblasten entstand. Die Hodenstückchen wiesen bloß ausnahmsweise ein Wachstum auf, wobei die Wachstumszone fast ausschließlich aus wachsenden Fibroblasten, zu denen manchmal auch wandernde Zellen in geringer

1) Vortrag in der IV. Allukrainischen Bakteriologentagung.
2) Näheres darüber wurde von mir in der IV. Allrussischen Bakteriologentagung berichtet.

Anzahl sich hinzugesellten, bestand. In einigen Kulturen von virulenter Milz wurden keine einigermaßen deutlichen progressiven Erscheinungen beobachtet, obwohl die Zellen des explantierten Stückchen ein ziemlich frisches Aussehen bewahrten. Die Stückchen von Milz und Niere vom neugeborenen Kaninchen wiesen in den beiden oben erwähnten Versuchsserien ausgezeichnetes Wachstum auf.

Derartige Explantate wurden nach 5—12tägigem (ältere Kulturen wurden von mir bis jetzt noch nicht eingeimpft) Verweilen im Brutschrank den Kaninchen in der Menge von 2—19 auf 18—25 qcm frischrasierter Haut nach Calmette und Guérin, oder in der Menge von 2—5 auf die Hornhaut geimpft.

Zur Kontrolle diente mir die am Tage der Anfertigung der Gewebskulturen unternommene Einimpfung bei Kaninchen ebensolcher Stückchen virulenter Organe, welche zur Anfertigung von Explantaten gebraucht wurden (Durchm. unter $1/2$ mm, Gewicht unter $1/2$ mg). Auf 18—25 qcm der Haut wurden nach der Methode von Calmette und Guérin 10 solcher Stückchen, also weniger als 0,005 g, und auf die Cornea 5, weniger als 0,0025 g des Organs, geimpft. Das Ergebnis war immer das Erscheinen einer konfluierenden Eruption auf der Haut oder einer spezifischen Keratitis mit Guarnierischen Körperchen.

Durch die Einimpfung der obenbeschriebenen Explantate gelang es mir, beim Kaninchen in allen Fällen 1. eine konfluierende oder fast konfluierende hämorrhagische Eruption auf der Haut und 2. eine spezifische Keratitis, bei der es immer Guarnierische Körperchen nachzuweisen gelang (Fixierung und Einbettung nach Paul und Färbung mit Eisenhämatoxylin), hervorzurufen. Die volle Entwicklung der Pusteln erfolgte 4—5 Tage nach der Impfung, wobei sie in allen unseren Fällen einen deutlich ausgesprochen hämorrhagischen Charakter trugen. In denjenigen Fällen (s. unten), wo am Rande der Impfbezirke eine nicht ganz konfluierende Eruption entstand, erreichte die Größe der einzelnen Pusteln $3/4$ cm i. Durchm.; die Pusteln selbst erschienen besonders saftig[1]). In der Hornhaut konnten immer 48 Std. nach der Impfung typische Guarnierische Körperchen in großer Anzahl nachgewiesen werden (s. Abb.).

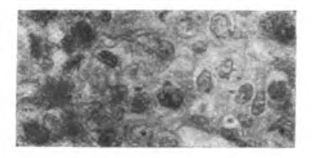


Fig. 1. Hornhautepithel mit Guarnierischen Körpercken von mit zwei 12tägigen Explantaten aus virulenter Milz infizierter Kaninchen Nr. 103 (Versuchsserie Nr. 10). Fixierung nach Paul, Färbung mit Eisenhämatoxylin. Zeiss, hom. Imm. 3 mm Projektionsok. Nr. 4.

Im ganzen wurden bis jetzt 10 Versuchsserien mit Explantation virulenter Milz- und Hodenstückchen angestellt, mit denen 27 Kaninchen infiziert wurden. Alle Versuche wurden so durchgeführt, daß sowohl die Einimpfung der explantierten Stückchen, wie auch das nachträgliche Verweilen der geimpften Kaninchen in einem Arbeitsraume, wo bis dahin mit Variola-Vakzinevirus nicht gearbeitet worden war, erfolgte. Da nach Einimpfung der Explantate es mir in allen Fällen ausnahmslos gelang, eine spezifische Keratitis mit Guarnierischen Körperchen in den Corneaepithelzellen hervorzurufen, muß die Spezifität der Infektion infolge der genannten Impfungen als zweifellos bewiesen gelten.

---

1) Diese Erscheinung beobachtete ich nicht selten auch bei anderen Versuchen bei Einimpfung eines Materials, welches ein von Begleitbakterien freies Passagevirus enthielt.

Wie erwähnt, ergab die Einimpfung von explantierten Milzstückchen ebensolche positive Resultate wie die Einimpfung von Hodenexplantaten. In den ersten Versuchsserien (Ausgangsmaterial die 11. bis 24. Generationen meines Stammes) schien es, als ob die Resultate der Einimpfung von Milzexplantaten quantitativ etwas schwächer seien (eine nicht ganz konfluierende Eruption auf der Haut); später konnte ich keinen deutlichen Unterschied zwischen den Resultaten der Impfung von Milz- oder Hodenexplantaten bemerken.

Ohne mir zunächst die Frage über die möglicherweise eintretende Virulenzsteigerung der explantierten Stückchen (was meines Erachtens übrigens keine entscheidende Rolle bei der Lösung der Frage über die Brauchbarkeit der Gewebskulturmethode zur Variola-Vakzineerforschung haben kann) zu stellen, habe ich eine Reihe von Versuchen angestellt, die feststellen sollten, ob während genannter Zeit keine deutliche Virulenzabschwächung der explantierten Stückchen erfolgt, da dies in hohem Maße gegen eine positive Entscheidung der oben erwähnten Frage sprechen würde. Zu diesem Zwecke wurde eine Haut- und Hornhauteinimpfung an Kaninchen mit abfallenden Mengen virulenten Milz- und Hodenexplantaten vorgenommen. Dabei gelang es, beim Kaninchen in allen Fällen eine konfluierende spezifische Eruption auf einem 15 qcm großen frisch rasierten Hautbezirk, oder eine spezifische Keratitis (mit Nachweis der Guarnierischen Körperchen) sogar bei Einimpfung von 2 derartigen Explantaten, die weniger als 0,001 g des Organs enthalten, hervorzurufen (s. Abb.). Noch geringere Mengen einzuimpfen, habe ich bis jetzt noch nicht versucht, aber schon auf Grund der oben angeführten Angaben darf man wohl mit Sicherheit behaupten, daß während der obenerwähnten Zeit es zu keiner bedeutenden Virulenzabschwächung der explantierten Stückchen kommt.

Beim Vergleich an meinem Material der Impfresultate von Milz- und Hodenexplantaten, die gutes Wachstum aufwiesen, und solcher, wo keine Wachstumerscheinungen zu vermerken waren, konnte ich keinen einigermaßen deutlichen Unterschied feststellen.

Zur vergleichenden Bewertung der bei Explantationsversuchen erhaltenen Resultate wurden parallele Versuche mit einfacher aseptischer Aufbewahrung von kleinen Stückchen von 1—3 mm Durchm. derselben Organe in geringen Mengen von Ringerscher Lösung bei 37—38° angestellt (5 Versuchsserien). Diese Versuche haben gezeigt, daß unter diesen Bedingungen eine allmähliche Abschwächung der Virulenz der so aufbewahrten Stückchen erfolgt, wobei die Milzstückchen schon nach 5 Tage langer Aufbewahrung bei Hauteinimpfung beim Kaninchen sich als gänzlich avirulent erwiesen. Die Virulenz der Hodenstückchen, welche zunächst während der ersten 5 Tage in dieser Beziehung keine merkliche Aenderung aufwiesen, war nach 11—15tägiger Aufbewahrung bedeutend abgeschwächt. Die Einimpfung von 0,005 g solcher Hodenstückchen auf die Haut des Kaninchens nach Calmette und Guérin war in meinen Versuchen positiv bloß in einem Teile aller Fälle, wobei anstelle der konfluierenden Eruption, wie bei Kontrollimpfungen mit frischen Organstückchen in der Regel bloß die Entwicklung einzelner Pusteln erfolgte. [Vgl. Gins (2)].

Auf diese Weise gelang es mir meiner Ansicht nach bei diesen Versuchen mit Bestimmtheit festzustellen, daß das mit den Stückchen virulenter Organe explantierte reine Vakzinevirus die Fähigkeit besitzt, unter diesen Bedingungen bei 37° bis 38° am Leben zu bleiben, ohne dabei (was von besonderem

Interesse zu sein scheint) einigermaßen merkliche Virulenzabschwächung mindestens während 12 Tage (maximale Dauer meiner Versuche) zu erleiden [vgl. Gins (2)].

Ich bin daher der Ansicht, daß die Gewebskulturmethode zum Studium der verschiedensten Variola-Vakzineprobleme mit Erfolg angewendet werden kann. Die von mir gebrauchte Methodik ist relativ einfach, erlaubt, mit einem reinen Virus von ungefähr ständiger Kraft zu arbeiten, und gewährt eine genügend genaue Bewertung der das in den Explantaten enthaltene Virus beeinflussenden Bedingungen. Gegenwärtig habe ich einige Serien von Versuchen angestellt, in denen ich die Explantationsmethode zur Erforschung der biologischen Eigenschaften des Vakzinevirus, speziell zur Aufsuchung der Bedingungen, welche eine Reinkultur des Virus zu erhalten erlauben würden, ebenso wie zum Studium einiger Fragen über die Immunität bei dieser Infektion anzuwenden versuche[1]).

Zusammenfassung.

1. Die Milz der Kaninchen enthielt auf der Höhe der durch Einimpfung in die Hoden des von Begleitbakterien freien Passagevakzinevirus hervorgerufenen Erkrankung dieses Virus in bedeutenden Mengen. — 2. Durch die Einimpfung in gesunde Kaninchen 5—12tägiger Explantate aus virulenten Milz und Hoden von mit reinem Passagevakzinevirus in den Hoden infizierten Kaninchen gelang es mir, in allen Fällen das Erscheinen einer in der Regel konfluierenden Hauteruption und einer spezifischen Keratitis (mit Nachweis von Guarnierischen Körperchen) hervorzurufen. — 3. Die Virulenz der 5 bis 12tägigen Milz- und Hodenexplantate zeigte in meinen Versuchen keine merkliche Abschwächung im Vergleiche zur Virulenz frischer Organe. Durch Hautimpfung am Kaninchen nach Calmette und Guérin zweier Explantate aus virulenter Milz oder Hoden, weniger als 0,001 g Organ enthaltend, gelang es stets, eine konfluierende spezifische Eruption auf einem Hautbezirk von 15 qcm zu erhalten; die Impfung ebensolcher Explantate auf die Hornhaut rief immer eine spezifische Keratitis mit Guarnierischen Körperchen hervor. — 4. An meinem Materiale war es unmöglich, einen Unterschied bezüglich der Folgen einer Impfung mit Milz- oder Hodenexplantaten, die ein gutes Wachstum aufwiesen, und solcher, wo gar keine Wachstumerscheinungen zu bemerken waren, festzustellen. Ebenso bedeutungslos schien nach meinen Versuchen die Anwesenheit in den Explantaten, außer den virulenten Hodenstückchen, von gut wachsenden Nieren- oder Milzstückchen vom neugeborenen Kaninchen.

---

1) Zum Schluß ist es mir eine angenehme Pflicht, meinen Dank Herrn Prof. M. P. Nestschadimenko für sein stetes Interesse an meiner Arbeit und Herrn Prof. A. A. Krontowski für seine wertvollen Ratschläge hinsichtlich der in dieser Arbeit angewendeten Explantationsmethodik auszusprechen.

Literatur.

Casagrandi, zit. nach Tomarkin u. Carrière—Fornet, Berl. klin. Woch. 1913. S. 1864 u. 2328; Rev. intern. de la vaccine. 1913. Nr. 2; Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 87. 1922. — Gins, (1) Berl. klin. Woch. 1914. Nr. 9; (2) Ztschr. f. Hyg. Bd. 82. 1916. — Hach, Verhdl. d. IV. Allukrain. Bakteriologentagung 1924. — Harde, Edna S., C. B. de la Soc. de Biol. T. 78. 1915. — Krontowski u. Hach, Münch. med. Woch. 1923. Nr. 5; Vortr. a. I. Allruss. Pathologentagung 1923. Nr. 36. Klin. Woch. 1924. — Noguchi, Journ. Exp. med. Vol. 21. 1915. p. 539. — Olitsky, Journ. Exp. med. Vol. 35. 1922. p. 115. — Paschen, Münch. med. Woch. 1906 u. 1908. — Paul zit. nach Lipschütz, Handb. d. mikrobiol. Techn. von Kraus u. Uhlenhuth, Bd. 1. H. 1. S. 397. — Plotz, Compt. Rend. Acad. Sc. Paris. T. 174. 1922. p. 1265; Ref. Bull. Pasteur. 1923. p. 563. — Pröscher, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 40. — Prowazek, Arb. a. d. Reichsgesundh.-Amt. Bd. 22 u. 23. — Prowazek u. Yamamoto, Münch. med. Woch. 1909. — Rocha-Lima, Erg. d. allg. Pathologie, 19. Jahrgang. 1. Heft. 1919. — Sato, Zeitschr. f. Immunitätsf. Bd. 32. S. 481; Ref. Bull. Pasteur. 1923. p. 300. — Steinhardt u. Grund, Journ. Inf. Dis. Vol. 16. — Steinhardt, Israeli u. Lambert, ibid. Vol. 13. — Steinhardt u. Lambert, ibid. Vol. 14. — Tomarkin u. Carrière, Handb. d. pathol. Mikroorgan. von Kolle u. Wassermann, 2. Aufl. Bd. 8. — Volpino, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 46, 49 u. 51; Pathologica. Vol. 13. 1922. Nr. 291 u. 295; Ref. Bull. Pasteur. 1923. p. 561.

Untersuchungen über den serologischen Nachweis experimenteller Kaninchensyphilis.

[Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für experimentelle Therapie und Biochemie, Berlin-Dahlem.]

Von **Hans Reiter.**

Das Bestreben, durch serologische Reaktionen einen Einblick in den Status der experimentellen Kaninchensyphilis gewinnen zu wollen, entspringt den an Menschen gemachten Beobachtungen mit ihren für Diagnose, Prognose und Therapie mehr oder weniger berechtigt gezogenen Schlußfolgerungen. Alle bis vor kurzem eingeschlagenen Wege erwiesen sich als wenig dankbar, da die Labilitätsstruktur der Kaninchensera zur Analyse andersartige Technik und andere Reagenzien zu erfordern schien als die in der Humanmedizin untersuchten Medien. — Erfolgreicher waren die Bemühungen von Noguchi, die Labilitätsbreite der Seren einzuschränken. Er verwendete Extrakte, die nur den azetonunlöslichen Anteil der Gewebslipoide enthielten, also Protein- und Glykogen-frei waren. Seine Befunde konnte neuerdings Illert[1]) bestätigen. — Andere Wege schlugen Sachs und Georgi[2]) ein, indem sie die labilste Globulinkomponente mit $n/_{250}$ HCl vor dem eigentlichen Versuch ausschalteten. (Die WaR. wurde darauf mit cholesterinierten Rinderherzextrakten angestellt, — Kaninchenserum

1) Klin. Woch. 1923. S. 1168.
2) Klin. Woch. 1923. S. 880.

und Komplement 10fach verdünnt —, und bei den Flockungsreaktionen ließ man 2 Teile 10fach verdünntes Kaninchenserum auf einen Teil 6fach verdünnten Extrakt einwirken.) Georgi und Steinfeld [1]) erhoben mit dieser Methode bei 43 normalen Kaninchen 43mal einen negativen serologischen Befund. Von 20 syphilitisch infizierten Kaninchen verhielten sich zur Zeit der serologischen Untersuchung 10 klinisch negativ, und auch serologisch ergab sich nach der Sachs-Georgischen Stabilisierungsmethode 10mal ein negatives Ergebnis. Bei 10 weiteren syphilitischen Kaninchen, die über eine längere Zeit hin beobachtet werden konnten, deckte sich in der Regel klinischer und serologischer Befund, wobei sich das serologische Verhalten nach der WaR. und SGR. im wesentlichen entsprachen. Die Stärke der Reaktion schloß sich im großen und ganzen dem Stand der klinischen Erkrankung an, während der Inkubationszeit und kurze Zeit nach Auftreten der ersten klinischen Krankheitszeichen reagierte das Serum meist noch negativ. — Im Ottoschen Laboratorium des Kochschen Institutes konnte Sato [2]) kürzlich diese Angaben von Georgi und Steinfeld für die SGR. nicht bestätigen, denn normale Kaninchensera verloren durch die HCl-Vorbehandlung keineswegs regelmäßig die positive Reaktion, ja, er beobachtete sogar u. U. ein Positivwerden primär negativer normaler Kaninchensera. Weit brauchbarere Ergebnisse erhielt er dagegen mit der MTR.^{3}, weniger günstigere ebenfalls mit der DMR. Sato prüfte 20 frisch injizierte Kaninchen auf ihr Verhalten bezüglich der MTR.^{1}, MTR.^{3}, WaR., DMR., SGR. und kam zu der Schlußfolgerung, daß Trübungs- und Flockungsreaktionen in allen Stadien günstigere Resultate ergeben, als die WaR. Mit der MTR.^{3} sah er bei 20 normalen Tieren des Hauptversuches nie eine positive Reaktion, dagegen bei 25 Tieren des Vorversuches zweimal eine positive und viermal eine zweifelhaft positive. Am besten deckt sich die MTR.^{3} mit dem klinischen Befund, doch waren auch die Ergebnisse der SGR. mit aktiven Sera fast annähernd so günstig.

Unser Versuchsmaterial gliedert sich in 3 Gruppen: In den beiden ersten Gruppen A u. B sollten verschiedene serologische Reaktionen miteinander verglichen werden, und zwar:

I. Einfache Wassermannsche Reaktion. II. WaR. mit HCl-Stabilisierung nach Sachs-Georgi. III. SGR. mit HCl-Stabilisierung nach Sachs-Georgi. IV. MTR.^{3}.

Gruppe A (vergl. Tab. A) enthalt die Angaben über 37 normale Kaninchensera, die z. T. einige Tage bereits infiziert waren; Gruppe B (vergl. Tab. B) die analogen Untersuchungen von 31 Seren infizierter Kaninchen, deren Infektion 3—25 Wochen zurücklag, die auch z. T. mit chemischen Präparaten behandelt worden waren. Alle Einzelheiten sind aus der Tabelle ersichtlich.

In der 3. Gruppe C sollte der Einfluß des klinischen Krankheitsverlaufes auf die MTR.^{3} geprüft werden.

Die Arbeitsmethoden hielten sich streng an die von den Autoren angegebenen Vorschriften (vergl. auch die Arbeit von Sato).

(In den Tabellen A u. B sind mit kleinen Buchstaben die einzelnen Tiere einer Versuchsserie bezeichnet, sie erleichtern den Vergleich zwischen dem Ausfall der verschiedenen Reaktionen. Zur Wiedergabe

1) Klin. Woch. 1923. S. 2309.
2) Zeitschr. f. Hyg. Bd. 100. u. 101.

der Untersuchungsresultate wurde eine Fragestellung gewählt, aus der ohne weiteres die Zahl der Fehldiagnosen ersichtlich ist.)

Tabelle A.

Nr. der Serien	Zahl der Tiere	Infekt.-Stamm	Alter der Infektion	I. WaR.	II. WaR. + $n/_{250}$ HCl	III. SG. + $n/_{250}$ HCl	IV. MTR.[3]	Klinischer Befund usw
1	6	36	11 Tage	a ++· b ++++ c — d θ e ++++ f ++++	a — b — c — d ++++ e — f —	a, b, c — d, e, f ±	a — b — c θ d ++++ e — f ++++	sämtl. negat
2	5	Filtrat	9 Tage	a, b ++++ c — d, e ++	sämtlich negativ	sämtlich negativ	a — b ++++ c, d, e —	„ „
3	3	64	1 Tag	a ++++ b — c ++++	a, b — c ±	a, b — c ±	sämtlich negativ	„ „
4	3	36	1 Tag	a, b ++++ c EH.	a, b — c EH.	a, b — c ±	sämtlich negativ	„ „
5	12	Filtrat	1 Tag	a, b, c, d ++++ e — f, i, m } g, h, k, l } ++++	a, b, c ++++ d ++ e — f, g ++++ h i ++ k, l m +++	a, b, c, d — f, i, k ± g, h + l, m ++	a—i — k, l ++++ m ++	„ „
6	3	Filtrat	0 Tage	a ++++ b, c ++	a ++++ b, c —	a + b, c ++	a ++++ b, c —	„ „
7	5	36	0 Tage	a, b, c, d, e θ	a, b ++++ c + d, e ++++	a, b, c — d ++ e —	a, b, c — d, e ++++	„ „

Zeichenerklärung: θ Reaktion nicht angestellt; — negativ; ± zweifelhaft positiv; ++++ stark positiv; + schwach positiv; ++, +++ Zwischenstufen; EH. Eigenhemmung.

Von 37 frisch infizierten klinisch negativen Tieren (vgl. Tab. A) waren serologisch positiv (= Fehldiagnose):

I	II	III	IV
26[1])	16	8[2])	9[3])

Von weiteren fünf, vor längerer Zeit infizierten, erfolgreich prophylaktisch behandelten und nie syphilitisch erkrankten negativen Tieren waren serologisch positiv (vgl. Tab. B: 8a, b; 13a; 14b; 16d):

I	II	III	IV
2[6])	1[4])	0[4])	0

Bei 42 klinisch negativen Seren wurden also Fehldiagnosen erhalten:

I	II	III	IV
28[1])	17[4])	8[5])	9[3])

Von 14 klinisch positiven Tieren waren serologisch negativ (= Fehldiagnose) (vgl. Tab. B: 10 a, b, 11 a, b, c, d, 12 a, b, c, 13 b, 15 a, b, c, d).

Nach	I	II	III	IV
	0[7])	2[8])[9])	2[8])[9])	0

Von vier klinisch leicht verdächtigen Tieren waren serologisch positiv (Tab. B 15 e, 16 a, b, c).

Nach	I	II	III	IV
	4	2	1	0

1) Dazu 6 × θ, zuzüglich 8 × ±. 2) Davon 3 11 Tage post. infect.
3) Davon 2 11 Tage post. infect. 4) Dazu 1 × ±, 1 × θ.
5) Dazu 9 × ±, 1 × θ. 6) Dazu 1 × θ.
7) Dazu 9 × θ. 8) Dazu 1 × θ. 9) 11 d schwach positiv, früher stark positiv.

Tabelle B.

Nr. der Serien	Zahl der Tiere	Infekt.-Stamm	Alter der Infektion	I. WaR.	II. WaR. +n/250 HCl	III. S.G. +n/250 HCl	IV. M.T.R.[3]	Klinischer Befund usw.
8	4	Filtrat	25 W.	a, b — c θ d θ	a, b — c θ d θ	a, b — c θ d ±	a, b — c, d —	a u. b: spezif. proph. behandelt, klinisch stets negativ c, d: spezif. unvollk. proph. behand.. klin. posit.; seit 10 W. neg.
9	2	36	23 „	a, b θ	a ++ b ±	a ++ b —	a ++++ b +	beide früher positiv a spezif. beh., seit 8 W. klin. negativ b unbehand., seit 4 W. klinisch fast negativ
10	3	Filtrat	19 „	a, b θ c θ	a +++ b θ c —	a ++++ b θ c —	a, b ++++ c —	a, b: positiv; c: früher posit., spez. behand., seit 8 W. klin. negat.
11	4	64	17 „	a ++++ b θ c θ d θ	a, b ++++ c ++ d —	a, b ++++ c ± d —	a, b, c, d ++++	a, b, c: positiv d: schwach pos., früher stark positiv
12	3	36	13 „	a, b, c θ	a ++++ b ± c —	a, b ++++ c —	a, b, c ++++	a, b, c: positiv a: 10 W. p. inf. erfolglos behandelt
13	2	Filtrat	6 „	a, b ++++	a ± b ++++	a ± b ++++	a — b ++++	a: negativ, proph. beh., stets neg. geblieben b: positiv
14	4	36	5 „	a, b, c, d ++++	a, b, c, d ++++	a, b — c, d +	a, b — c, d ++++	b: negativ, proph. beh., stets neg. geblieben a, c, d: negat., 2—3 W. später positiv!
15	5	Filtrat	5 „	a, b, c, d, e ++++	a, b, c, d, e ++++	a, b, c, d ++ e +	a, b, c, d ++++	a, b, c, d: positiv! e: o. B.? später positiv.
16	4	36	3 „	a, b, c ++++ d θ	a, b — c ++++ d θ	a, b, c — d θ	a, b, c, d —	a, b, c: verd., 10 Tage später positiv d: negativ, proph. beh.

Zeichenerklärung: θ Reaktion nicht angestellt; — negativ; ± zweifelhaft positiv; ++++ stark positiv, + schwach positiv, ++, +++ Zwischenstufen; W. = Woche.

Klinisch zur Zeit der Untersuchung gesund, früher positiv waren folgende 5 Fälle; sie zeigen nebenstehendes serologisches Verhalten, Einzelheiten siehe Tab. B.

Nach	I	II	III	IV
8 c[10])	θ	θ	θ	—
8 d[10])	θ	θ	±	—
9 a[11])	θ	++	++	++++
9 b[12])	θ	±	—	+
10 c[13])	θ	—	—	—

Drei klinisch zur Zeit der 6. Infektionswoche noch negative Fälle, die zwei bis drei Wochen später klinisch erkrankten, reagierten in folgender Weise (14 a, c, d):

	I	II	III	IV
14 a	++++	++++	—	—
14 c, d	++++	++++	+	++++

10) Seit 10 Wochen klinisch negativ.
11) „ 4 „ „ „
12) „ 4 „ „ „
13) „ 8 „ „ „

Tabelle

Nr.	Tier	Stamm	Infekt.-Datum	Infektions								
				1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.
1.	674	36	3. 3.	.	S —	.	.	S ++++ Kl +	.	Th S ++++ Sp —	S ++++	S +++
2.	822	36	3. 3.	.	S —	.	.	S ++++ Kl —	.	S ++++	.	S ++++ Kl +
3.	824	36	3. 3.	.	S ±	.	.	S —	.	S —	Kl +	S ++
4.	823	36	3. 3.	.	S ++++	.	.	S ++++	Kl +	S ++++	.	Th S ++++
5.	675	36	3. 3.	.	S —	.	.	S ++++	.	Kl + S ++++	.	Kl + S ++++
6.	825	36	3. 3.	.	S ++++	.	.	S ++++	Sp +++	Th S ++++ Sp —	†	.
7.	312	F	6. 3.	.	S —	.	S ++++	Kl + S ++++	.	.	Sp ++ Th	S ++
8.	316	F	6. 3.	Pr	S ++++	.	S ++++	Kl + S ++++	Kl +	Kl +	Kl +	S ++++
9.	320	F	6. 3.	Pr	S —	.	S ++++	Kl + S ++++	Kl +	Kl +	Kl +	S ++++
10.	318	F	6. 3.	Pr	S —	.	S ++++	Kl + S ++++	.	.	Th S ++++ Sp —	.
11.	319	F	6. 3.	.	S —	.	S ++++	Kl + S ++++	.	.	S ++	.
12.	323	64	13. 3.	S —	.	.	S —	S ++++	.	S ++++ Kl +	.	.
13.	449	64	13. 3.	S —	.	.	S ++++	S ++++	Kl + Sp ++	S ++++ Kl + Th Sp —	.	.
14.	550	64	13. 3.	S —	.	.	S ±	S ++++	.	S ++++ Kl +	.	.
15.	438	36	13. 3.	S —	.	.	S ++++	S ++++	.	S ++++	Kl +	Th Sp —
16.	570	36	13. 3.	S —	.	.	S —	S +	.	S +++	Kl +	Th_1
17.	575	36	13. 3.	S —	.	.	S ±	S ++++	.	S ++++	Kl +	.

C

wochen									Bemerkungen
10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17	18.	
Kl —	S —	Kl —	Kl —	.	.	S —	.	.	Th 451, wirksame Dosis
.	.	Kl +	.	Kl +	.	Kl +	.	.	.
Th	Kl + Sp +	.	Kl + Sp +	.	Kl + Sp +	.	Kl + Sp +	Kl + S ++++	Th Stovarsol, unwirksame Dosis
Kl + Sp +	Kl + Sp +	Kl + Sp +	.	.	.	.	.	.	Th Stovarsol, unwirksame Dosis
Kl +	Kl +	Kl +	.	.	.	.	.	.	
.	.	.	.	.	.	.	.	.	Th 451, wirksame Dosis
Sp —	†	.	.	.	.	.	.	.	Th 451, wirksame Dosis
Kl +	Kl +	.	.	.	.	.	.	.	Pr 508, unwirksame Dosis
Kl +	S ++++	Kl +	.	.	.	.	.	.	Pr 508, unwirksame Dosis
.	S —	.	.	Kl —	.	†	.	.	Pr 508, unwirksame Dosis Th 451, wirksame Dosis
.	.	.	.	.	Kl +	Th	Kl +	S +	Th 522
.	Kl + Sp +	†	.	.	.	.	.	.	.
S ± Sp —	Kl —	.	.	.	.	.	.	.	Th Salvarsan, wirksame Dosis
.	.	.	.	.	Kl +	Th	S — Kl —	.	Th 535, wirksame Dosis
†	.	.	.	.	.	.	.	.	Th Salvarsan, wirksame Dosis
Sp +	Sp +	.	Th_2 Kl +	.	Kl +	.	S —	.	Th_1 Salv., unwks. Dosis, Th_2 521
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Nr.	Tier	Stamm	Infekt.-Datum	Infektions								
				1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.
18.	578	F	19. 3.	S —	S ±	S ++++	S ++++	Kl +	S ++++	.	Th Sp —	†
19.	596	F	19. 3.	S — Pr	.	S —	S —	.	S ++++ Kl ±	.	.	.
20.	145	F	19. 3.	S — Pr	S —	.	S ++++	.	S ++++ Kl +	.	.	.
21.	54	F	19. 3.	S —	S —	S —	S —	S ++++ Kl +	.	.	.	.
22.	124	F	19. 3.	S — Pr	S —	S —	S ++++	S ++++ Kl +	.	.	.	.
23.	971	F	19. 3.	S — Pr	S —	S ++++	S ++++	S ++++ Kl +	.	.	Th	.
24.	741	F	19. 3.	S —	S —	S ++++	S ++++	S ++++ Kl +	.	.	.	.
25.	590	F	19. 3.	S —	S —	S ++++	.	S ++++ Kl +	.	.	.	.
26.	135	F	19.3.	S — Pr	S ++++ (?)	S —	S ++	.	S + Kl —	†	.	.
27.	576	F	19. 3.	S ++++	S ++++	S ++++	.	.	S ++++ Kl +	†	.	.
28.	592	F	19. 3.	S ++++ Pr	S ±	S —	S ++++	.	S ++++ Kl +	.	.	.
29.	597	F	19. 3.	S +	S ±	S —	S +++	.	S ++++ Kl +	.	.	.
30.	2	F	24. 3.	S ++++	.	S +++	.	.	S ++++	Kl +	Th Sp —	S ++++ Sp —
31.	5	F	24. 3	S —	.	S +++	.	.	S ++++	Kl +	.	.
32.	8	F	24. 3.	S —	.	S —	.	.	S ++++	Kl + Th	.	S ++++
33.	27	36	7. 4.	S —	.	S ++++	.	.	Kl +	Th	.	Sp ±
34.	28	36	7. 4	S —	.	S ++++	.	.	Kl +	.	.	.
35.	26	36	7. 4.	S —	.	S ++++	.	.	Kl +	Th	.	Sp ±
36.	30	36	7. 4	S ++++	.	S ++++	.	.	Kl +	.	.	.

wochen									Bemerkungen
10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.	18.	
.	.	.	.	.	.	.	.	.	Th Salvarsan, wirksame Dosis
.	.	.	.	.	.	Kl + Th	S ++	.	Pr 508, mäßig wirksame Dosis Th 525
.	.	.	.	.	.	.	.	.	Pr 510, mäßig wirksame Dosis
.	.	.	.	.	.	Th Kl +	S —	.	Th 534, wirksame Dosis
.	.	.	.	.	.	.	Kl + S?	.	Pr 508, unwirksame Dosis
Sp +	.	.	†	.	.	.	.	.	Pr510 unwirk.D. Th Salvarsan unwirksame Dosis
Th Sp —	.	.	.	.	.	.	:	.	Th 451, wirksame Dosis
.	.	.	.	.	.	.	S +++ Kl +	.	.
.	.	.	.	.	.	.	.	.	Pr 508. mäßig wirksame Dosis
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
.	.	.	.	.	.	Kl +	S ++++	.	Pr 508, unwirksame Dosis
.	†	.	.	.	.	.	.	.	.
.	.	.	.	Kl —	†	.	.	.	Th 451, wirksame Dosis
.	.	.	.	Kl +	S ++++	.	.	.	.
†	.	.	.	.	.	.	.	.	Th Stovarsal, unwirksame Dosis
.	.	.	.	Kl + S —	.		.	.	Th451, wirksame Dosis
.	†	.	.	.	.	.	.	.	.
Kl —	.	.	.	Kl — S —	.	.	.	.	Th 451, wirksame Dosis
†	.	.	.	.	.	.	.	.	

Nr.	Tier	Stamm	Infekt.-Datum	Infektions								
				1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.
37.	29	36	7. 4.	S ++++	.	S ++++	.	.	Kl +	Th Sp —	.	.
38.	31	F	12. 4.	S — Pr	.	S —	.	.	.	Kl + S ++++	.	.
39.	32	F	12. 4.	S -- Pr	.	S —	.	.	.	Kl + S ++++	.	.
40.	33	F	12. 4.	S —	.	++++	.	.	.	Kl + S ++++	.	.
41	34	F	12. 4.	S — Pr	.	†	.	.	.	.	.	.
42.	35	F	12. 4.	S —	.	S —	.	.	.	Kl + S ++++	.	†
43.	36	F	12. 4.	S — Pr	.	†	.	.	.	.	.	.
44.	37	F	12. 4.	S ++++	.	S ++++	.	.	.	Kl +	.	.
45.	38	F	12. 4.	S —	.	S ++++	.	.	.	Kl +	.	.
46.	39	F	12. 4.	S ± Pr	.	†	.	.	.	.	.	.
47.	40	F	12. 4.	S —	.	S —	.	.	.	Kl ? S ++++	.	.
48.	41	F	12. 4.	S —	.	S ++	.	.	.	Kl + S ++++	.	.
49.	42	F	12. 4.	S ± Pr	.	†	.	.	.	.	.	.
50.	43	RK	15. 4.	S —	.	.	S — 2. Inf. F	.	.	S —	.	.
51.	44	RK	15. 4.	S ±	.	.	S — 2. Inf. F	.	.	S —	†	.
52.	45	RK	15. 4.	S ±	.	.	S — 2. Inf. F	.	.	S ++	.	.
53.	76	F	28. 4.	S — Pr	.	.	.	S ++++ Kl —	.	Kl +	.	.
54.	77	F	28. 4.	S —	.	.	.	S ++++ Kl —	.	Kl +	.	†
55.	78	F	28. 4.	S ++++	.	.	.	.	.	Kl +	.	.
56.	79	F	28. 4.	S —	.	.	.	S ++++ Kl —	.	Kl +	.	.

wochen									Bemerkungen
10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.	18.	
Kl −	.	.	Kl −	S +++	Kl +	S ++++	.	.	Th 451
.	.	Kl + Th	Kl — S —	.	.	.	.	.	Pr Stovarsol unwirksam Th 523
†	.	.	.	.	.	.	.	.	Pr Stovarsol, unwirksame Dosis
.	.	Kl + Th	S +++	.	.	.	.	.	Th 531
.	.	.	.	.	.	.	.	.	Pr Stovarsol
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
.	.	.	.	.	.	.	.	.	Pr 451
.	.	Kl + Th	S +++	.	S ++++	.	.	.	Th 519
.	.	Kl + Th	Kl ± S +++	†	.	.	.	.	Th 531
.	.	.	.	.	.	.	.	.	Pr 451
.	.	†	.	.	.	.	.	.	.
.	Kl +	Th	S ±	.	.	.	.	.	Th 534
.	.	.	.	.	.	.	.	.	Pr 451
.	S +++ Kl (+)	Kl +	Th Sp +	S ++++	.	.	.	.	Th 534 unwirksame Dosis
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
.	S ++ Kl (+)	Kl —	Kl —	S ++++	.	.	.	.	
.	S ++++ Kl +	.	.	.	.	.	.	.	Pr 451 ungenügende Dosis
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Kl +	S ++++ Kl +	.	.	.	.	.	.	.	.
.	S ++++ Kl +	.	.	.	.	.	.	.	.

Nr.	Tier	Stamm	Infekt.-Datum	Infektions								
				1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.
57.	80	F	28. 4.	S ++++	.	.	.	.	Kl —	Kl +	†	.
58.	81	F	28. 4.	S ++++	.	.	.	.	.	Kl +	.	.
59.	82	F	28. 4.	S ++ Pr	.	.	.	S ++++	.	Kl +	.	.
60.	83	F	28. 4.	S — Pr	.	.	.	S ++++	.	Kl +	.	.
61.	84	F	28. 4.	S — Pr	†	.	.	.	.	.	.	.
62.	85	F	28. 4.	S —	†	.	.	.	.	.	.	.
63.	86	F	28. 4.	S — Pr	.	.	.	S ++++	.	Kl +	.	.
64.	87	F	28. 4.	S — Pr	†	.	.	.	.	.	.	.
65.	151	36	7. 5.	S — Pr	.	†	.	.	.	.	.	.
66.	152	36	7. 5.	S — Pr	.	†	.	.	.	.	.	.
67.	153	36	7. 5.	S — Pr	.	.	S —	.	.	.	Kl (+)	Kl +
68.	154	36	7. 5.	S —	†	.	.	.	.	.	.	.
69.	155	36	7. 5.	S — Pr	.	.	S ++++	.	.	Kl +	.	.
70.	156	36	7. 5.	S — Pr	†	.	.	.	.	.	.	.
71.	157	36	7. 5.	S —	.	.	S ±	.	.	.	.	Kl +
72.	158	36	7. 5.	S —	.	.	.	.	.	Kl (+)	.	.
73.	159	36	7. 5.	S —	.	.	S —	.	.	Kl +	.	.
74.	160	36	7. 5	S +++	.	.	.	.	.	Kl (+)	.	.
75.	170	F	14. 5.	S —	.	S —	.	.	Kl +	.	.	S ++++ Kl +
76.	171	F	14. 5.	S —	.	S ++++	.	.	Kl +	.	.	S ++++ Kl +

wochen									Bemerkungen
10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.	18.	
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
.	S ++++ Kl +	.	.	.	.	.	.	.	.
Th	S +++ Kl +	.	S ++++	.	.	.	.	.	Pr Stovarsol, unwirksame Dosis Th 520 unwirk. D.
.	S ++++ Kl +	.	.	.	.	.	.	.	Pr Stovarsol, unwirksame Dosis
.	.	.	.	.	.	.	.	.	Pr Stovarsol
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
.	S ++++ Kl ±	.	.	.	.	.	.	.	Pr 451, ungenüg. Dosis
.	.	.	.	.	.	.	.	.	Pr 451
.	.	.	.	.	.	.	.	.	Pr 451
.	.	.	.	.	.	.	.	.	Pr 451
S ++++	.	.	.	.	.	.	.	.	Pr 510 ungenügende Dosis
.	.	.	.	.	.	.	.	.	
S ++++ Kl +	Th	S —	.	.	.	.	.	.	Pr Salvarsan, unwirksame Dosis Th 530 wirks. Dos.
.	.	.	.	.	.	.	.	.	Pr Salvarsan
.	Kl + S —	Th Sp —	Sp ++ S —	.	.	.	.	.	Th 520, ungenüg. Dosis
S ++++ Kl (+)	.	.	.	.	.	.	.	.	.
S ++++ Kl +	.	.	.	.	.	.	.	.	.
S ++ Kl (+)	.	S ++++ Kl +	.	.	.	.	.	.	.
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
.	S ++++ Kl +	.	.	.	.	.	.	.	

Nr.	Tier	Stamm	Infekt.-Datum	Infektion								
				1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.
77.	172	F	14. 5.	S ++++	.	.	.	.	Kl +	.	.	S ++++ Kl +
78.	173	F	14. 5.	S —	.	S —	.	.	Kl +	.	.	S +++ Kl +
79.	174	F	14. 5.	S ++	.	.	.	.	Kl ±	.	.	S ++++ Kl ±
80.	175	F	14. 5.	S ++	.	.	.	.	Kl +	.	.	S +++ Kl +

Zeichenerklärung: In Tabelle sind nur die wichtigsten Untersuchungen auf-
peutische Präparate. S = MTR.[3]; Sp = Spirochäten; Kl = klinischer

Unter Benützung der MTR[3] waren von 80 nicht oder eben infizierten Tieren 14 stark[1]), 3 schwach positiv, es ergibt sich also eine Fehldiagnose in 17,5 bezügl. 21,25 Proz.

Im weiteren Verlaufe der Infektion wurde die negative Reaktion meist im Laufe der 3., 4. oder 5. Woche der Infektion positiv, entweder gleichzeitig mit der klinischen Manifestation oder früher. Bei klinisch negativem Befund konnte ein positiver Umschlag, der bisher negativ ausgefallenen serologischen Reaktion als sichere Voranzeige des „Haftens" der Infektion aufgefaßt werden. Der serologische und klinische Verlauf wurde offenbar vom Charakter der Infektion bestimmt: der gleiche Stamm zeigte Schwankungen in der Wirkungsintensität, abhängig vielleicht vom Zeitpunkt und der Intensität der Infektion des Ausgangstieres, von der Anzahl und der Vitalität der zur Verimpfung gelangten Spirochäten, von der Schnelligkeit des Impfprozesses u. a. War der klinische Befund einwandsfrei positiv geworden, dann fiel auch die serologische Reaktion positiv aus. (Nur eine Ausnahme Tier 157.)

Versuche, den Gang der Infektion durch kleine Dosen spezifisch wirksamer Chemikalien prophylaktisch zu modifizieren, zeigten, daß bei dem vorliegenden Tiermaterial in den zur Anwendung gebrachten Mengen es nicht gelang, weder auf den serologischen noch auf den klinischen Verlauf der Infektion einen Einfluß auszuüben. Die in einzelnen Fällen beobachtete geringe Verzögerung der Infektion zeigt nichts Auffälliges und ist auch anders erklärbar. Daß es andererseits gelingt, durch Verwendung genügend wirksamer Spezifica die Infektion zu verhüten, zeigen einige in der Tabelle B angeführte Tiere (8a, b, 13a, 14b, 16d), bei denen parallel dem negativ bleibenden klinischen Befund auch die negative Seroreaktion (MTR.[3]) bestehen blieb. Es kann also das serologische Negativbleiben geimpfter Tiere als Beweis für das Nichthaften der Infektion angesehen werden. Vielleicht ist gerade bezüglich dieses Phänomens die serologische Reaktion bei experimenteller Kaninchensyphilis berufen, einen Einblick in die immunbiologischen

1) davon 2 am 11. Tag der Infektion!

wochen									Bemerkungen
10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.	18.	
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Kl +	Kl +	.	.	.	.	.	.	.	.
.	Th	S ++++	.	.	.	.	.	.	Th 524, unwirksame Dosis

genommen, die Ziffern unter „Bemerkungen" bezeichnen verschiedene chemothera-
Befund; Pr = Prophylaxe; Th = Therapie; † gestorben oder getötet.

Verhältnisse zu geben, durch die das Freibleiben der Tiere in dem einen Fall, das prompte Haften der Infektion in dem anderen Falle und schließlich die besonders schwere Infektion bei unzureichender spezifischer Behandlung (Mulzer) dem Verständnis näher gebracht wird.

Wurden mehrere Wochen nach Infektion bei ausgesprochenem positiven klinischen Befund, der mit der serologischen positiven Reaktion stets parallel ging, die Tiere spezifisch chemotherapeutisch beeinflußt, dann verschwand parallel dem positiven klinischen Befund auch die positive serologische Reaktion (Tier Nr. 1, 7, 10, 13, 14, 33, 35, 38, 48). Nur bei Tier 37, das bereits vor der Impfung serologisch positiv reagiert hatte, blieb die serologische Reaktion positiv. Das Ergebnis serologischer Untersuchungen aller primär positiven Tiere ist also wertlos und wird nie zu irgendwelchen Schlüssen verleiten dürfen.

Schlußfolgerung: Ein Vergleich von Original-WaR., WaR. und SGR., stabilisiert nach Sachs-Georgi, ferner von MTR.[3] zeigt, daß bei nichtinfizierten Kaninchen die MTR.[3] und die Sachs-Georgische Modifikation die brauchbarsten Resultate liefern. Bei größerer Einfachheit gibt aber die MTR.[3] zweifellos die eindeutigsten Ergebnisse. Prüft man die MTR.[3] in verschiedensten Infektionsstadien, so kann festgestellt werden, daß primär eine Anzahl nichtgeimpfter Kaninchen positiv reagieren, bei Ausschaltung dieser gewährt die Reaktion jedoch einen wertvollen Einblick in den Infektionsverlauf. Sie geht etwa mit der Infektion parallel, meldet unter Umständen bei negativ klinischem Befund das Haften der Infektion vorzeitig an und zeigt die Beeinflussung der Infektion durch spezifische Prophylaktica und Therapeutica. Zurzeit kann die MTR.[3] als ein wertvolles Hilfsmittel zur Aufklärung immunbiologischer Vorgänge bei der experimentellen Kaninchensyphilis gelten. Die Gründe, aus denen die MTR.[3] in gewissen Fällen nicht syphilitisch infizierter Kaninchen positiv

ausfällt und ihre Anwendung bei diesen Tieren daher wertlos macht, bedürfen noch weiterer Erklärungen.

Anmerkung bei der Korrektur! Eine Mitteilung von Manteufel und Beger über „Die Serodiagnose der Kaninchensyphilis“ (D. M. W. 1924, S. 269) kam mir erst nach Abschluß der Arbeit zu Gesicht. Diese Mitteilung, die bei der Korrektur keine Berücksichtigung mehr finden konnte, gibt einen weiteren Beitrag zur Klärung vorliegender Fragestellungen.

Anaphylaxie bei antirabischen und anderen Impfungen [1].

(Aus dem Odessaer Staatsbakteriologischen Institute und aus dem Poltawer Pasteur-Institut.)

Von Dr. **Otto Herrmann**

Vorstand des Poltawer Pasteur-Instituts.

Wie nicht zu verwundern, ist erst in letzter Zeit bemerkt worden, daß die ex tempore hergestellte antirabische Emulsion aus dem Kaninchenrückenmark nicht immer gänzlich steril ist.

Nach Kühne kommen Verunreinigungen derselben durch Kokken, Bazillen und andere Bakterien beim Gebrauche des frischen Markes in 83,3 Proz., des ausgetrockneten in 80 Proz. und des glyzerinisierten in 68,7 Proz. vor, und die Rötungen und Infiltrate an der Impfstelle sind auf Mischbakterien zurückzuführen.

Auch Remlinger fand, daß diese Emulsion selten steril ist, und ist ebenfalls der Ansicht, daß die Lokalreaktionen: Rötungen, Infiltrate, sogar Abszesse, auf diese Verunreinigung zurückzuführen sind.

Lubinski kam nach Prüfung der Emulsion zu dem Ergebnis, daß bei rechtzeitiger Tötung der Passagekaninchen frisches sowie auch ausgetrocknetes Mark nur in 20 Proz. nicht steril ist, und daß folglich die Lokalreaktionen nicht den Mischbakterien zuzuschreiben sind.

Ganz unabhängig von diesen Arbeiten habe ich vor längerer Zeit die in Odessa gebrauchten Emulsionen auf ihre Sterilität geprüft, und ich muß bemerken, daß in jedem Falle das Blut der Kaninchen auf Agar-Agar und das Gehirn auf Bouillon und Agar-Agar ausgesät und solches Mark gebraucht wurde, dessen Aussaaten völlig steril waren. Demungeachtet war die Emulsion vor und nach den Impfungen sehr oft nicht steril. Es hat mich daher gewundert, daß bei so häufigen Verunreinigungen des Impfstoffes Infiltrate verhältnismäßig selten vorkommen, und zwar nur an gewissen Tagen nach Beginn der Impfungen.

1922, 1923 und anfangs 1924 habe ich in der Pasteur-Abteilung des Odessaer Bakteriologischen Instituts in den in Tab. I angegebenen Fällen Infiltrate beobachtet:

---

1) Vortrag, gehalten auf dem IV. Allrussischen Kongreß der Bakteriologen, Epidemiologen und Sanitätsärzte, 17.—20. April 1924 in Kiew.

Tabelle I.

Journal-Nr.	Name	Alter	Geschlecht	Nach welchen Impfungen erschienen Infiltrate?													
20 20	R. Ch.	18	w.	nach der	.	.	6.	7.	8.	.	.	.	.	.	.	.	Impfung
157 29	W. B.	14	m.	„ „	.	.	6.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	„
166/38	N. M.	40	m.	„ „	.	.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	.	.	.	.	„
170/42	M. I.	24	w.	„ „	.	.	.	.	.	9.	.	.	.	13.	.	.	„
177/49	I. M.	35	m.	„ „	.	.	.	7.	.	.	.	.	.	.	.	.	„
199/71	G. R.	55	w.	„ „	.	.	.	.	.	9.	.	.	.	.	.	.	„
329/110	L. K.	37	w.	„ „	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	„
1223/203	N. L.	7	w.	„ „	4.	5.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	„
1528/107	M. K.	41	m.	„ „	.	.	.	.	.	.	.	.	.	13.	14.	.	„
151 26	W. A.	28	w.	„ „	.	.	6.	7.	.	.	.	.	.	.	.	.	„
1647/78	F. F.	45	w.	„ „	.	.	.	.	8	.	.	.	.	.	.	.	„
1651/82	R. F.	16	w.	„ „	.	.	6.	7.	.	.	.	.	.	.	.	.	„
1746 90	D. D.	29	m.	„ „	.	.	.	7.	.	.	.	.	.	.	.	.	„
1747/91	D. N.	53	w.	„ „	.	.	.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	.	.	.	„
5/5	G.Sch.	57	m.	„ „	.	.	6.	7.	.	.	.	.	.	.	.	.	„
57/57	R. W.	28	w.	„ „	.	5.	6.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	„
58/58	L. Sch.	39	w.	„ „	.	.	6.	7.	.	.	.	.	.	.	.	.	„

Wir sehen daraus, daß die Infiltrate zumeist nach der 6., 7., 8. 9. Impfung und nur selten nach der 4.—5. oder nach der 10.—11. und später erscheinen, dabei immer an Stellen, an welchen an demselben Tage oder 1 Tag vorher injiziert wurde. Bei weniger empfindlichen Personen kommen nur 1—2 Infiltrate vor, welche die Patienten nicht besonders belästigen, andere dagegen bekommen, von einem gewissen Tage an, beinahe täglich neue Infiltrate bis zum Ende der Schutzimpfungen; diese Infiltrate sind mitunter sehr groß (ca. 10 cm im Durchmesser) und schmerzhaft; doch habe ich keinen einzigen Abszeß beobachtet. Die Infiltrate sind bei Kindern bedeutend seltener als bei Erwachsenen, obwohl ihnen in Odessa dasselbe Quantum eingeimpft wird. Entstünden die Infiltrate infolge Bakterienverunreinigung der Emulsion, wie Kühne oder Remlinger annehmen, so kämen sie an beliebigen Tagen nach Beginn der Impfungen und massenweise vor.

Ich muß noch bemerken, daß Infiltrate auch dann vorkommen, wenn absolut sterile Emulsionen einverleibt werden. So habe ich 16 Personen immunisiert mit einer 2 Wochen alten 1proz. Emulsion von Kaninchengehirn und -Rückenmark in Kochsalzlösung plus $^1/_2$proz. Karbolsäure, welche vor dem Gebrauche auf ihre Sterilität untersucht wurde. Bei 2 wurden Infiltrate nach der 6. und 7. Impfung konstatiert.

Ich glaube daher schließen zu können, daß die Infiltrate an den Impfstellen am allerwenigsten als Folge der Bakterienverunreinigung der Emulsion während der Zubereitung derselben oder während der Impfungen erklärt werden können, sondern hauptsächlich als anaphylaktische Erscheinungen nach dem Einführen fremdartiger Eiweißkörper in den Organismus. Charakteristisch ist z. B. folgender Fall:

W. K. (Nr. 1454/33), ein erwachsener Mann, bekam am 6. 10. eine Impfung und kam erst am 17. 10., also nach 11 Tagen, wieder, worauf er dann zum 2. Male geimpft wurde. Am nächsten Tage zeigte sich an der Stelle der Injektion ein Infiltrat von 6—7 cm im Durchmesser, während nach der 1. Impfung keine Lokalreaktion vorhanden war.

Selten ist die Lokalreaktion nach Wutschutzimpfungen mit einer Temperatursteigerung verbunden. Letztere habe ich nur bei 2 bemerkt, nämlich:

Bei R. Ch. (Nr. 20/20) betrug die Temperatur nach der 6. Impfung morgens 37,6°, abends 38°; nach der 7. Impfung morgens 37,2°, abends 37,5°. Bei L. K. (Nr. 329/10)) stieg die Temperatur abends auf 38° (und etwas über), an den Tagen des Auftretens neuer Infiltrate. Manche Patienten empfinden an der Impfstelle starken Juckreiz und manche klagen auch über Schmerzen in den Gelenken.

Alle diese Erscheinungen erinnern sehr an die Serumkrankheit, jedoch habe ich andere Symptome derselben, nämlich: 1) Urticaria, 2) Anschwellen der Drüsen, 3) Oedeme usw. niemals bemerkt.

Während ich diese Beobachtungen an Menschen machte, interessierte mich gleichzeitig die Frage, wie Kaninchen und Meerschweinchen auf solche Impfungen reagieren.

Da ich schon längere Zeit das Immunisationsvermögen verschiedener Vakzine geprüft habe, habe ich gleichzeitig einen Teil der Versuchstiere während der Immunisierung und noch etwas danach täglich gewogen und bei ihnen die Temperatur gemessen.

Zur Immunisierung habe ich folgende Vakzine verwendet: 1) Die gewöhnliche, ex tempore zubereitete Emulsion aus Kaninchenrückenmark. Jede Serie fing an mit 4tägigem und endete mit 1tägigem Mark nach der von mir im Odessaer Bakteriolog. Institute und im Poltawer Pasteur-Institute für Schutzimpfungen gegen Lyssa eingeführten Methodik (4, 3, 2, 1, 4, 3, 2, 1 usw.). — 2) Indem ich die Herstellungsmethode verschiedener Vakzine von René Zivi variierte, habe ich Emulsionen aus Kaninchengehirn und -Rückenmark bei 37° C 10 Min. und dann ebenso lange im Eisschrank gehalten. Dies wurde 3mal wiederholt, worauf 1/2 Proz. Ac. carbol. hinzugefügt wurde. Wir nennen diese Vakzine „37—0“. — 3) Dann habe ich 1proz. und

Tabelle II.

Tier	Immunisiert			Temp. während der Impf.		Temp. n. Beend. d. Impfung		An welchem Tage Temperatursteigerung?						Gewicht in g			
														während der Impfung		nach der Impfung	
	womit	zu wieviel ccm	Wieviel Tage	Minim.	Maxim.	Minim.	Maxim.	9.	10.	11.	12.	16.	22.	an-fangs	am Ende	nach wieviel Tagen	Ge-wicht in g
Kan. 94	4–1täg. Mark	4	24	38,9	39,8	38,7	39,3	—	—	—	—	—	—	1360	1495	14	1545
„ 102		4	24	39,0	**40,4**	38,9	39,3	—	**40,4**	—	—	—	—	1160	1435	6	1485
„ 103		4	24	38,9	**40,4**	38,7	39,5	**40,4**	**40,4**	—	—	—	—	1810	2050	11	2095
„ 104		2	30	38,8	40,0	39,1	39,6	—	—	—	—	—	—	1355	1590	14	1465
„ 105		2	30	39,1	40,0	39,3	39,6	—	—	—	—	—	—	1200	1405	—	—
M. 85		1	20	38,4	**39,4**	—	—	**39,4**	—	—	—	—	—	400	465	—	—
Kan. 97	1% Vakz. „37–0“	4	24	38,5	40,0	39,1	39,6	—	—	—	—	—	—	1050	1140	8	1305
„ 95		4	24	38,7	**40,5**	39,0	39,5	—	**40,2**	**40,2**	—	**40,5**	—	1465	1565	8	1665
„ 96		4	24	38,7	**40,3**	39,1	39,4	—	—	**40,3**	—	—	—	1165	1235	8	1305
„ 101		4	24	38,9	**40,3**	39,2	39,7	—	**40,2**	**40,3**	—	—	—	1485	1615	8	1620
Kan. 91	1% Vakz. „58–60“	4	24	38,8	39,8	—	—	—	—	—	—	—	—	1320	1275	—	—
„ 111		4	24	38,3	39,7	39,0	40,0	—	—	—	—	—	—	1135	1110	18	1170
„ 90		4	24	38,7	39,3	39,1	39,7	—	—	—	—	—	—	1345	1545	18	1690
M. 98		1	16	38,4	**39,2**	38,5	38,9	—	—	—	**39,2**	—	—	440	525	5	520
„ 99		1	20	38,2	38,8	—	—	—	—	—	—	—	—	505	570	—	—
Kan. 132	2% Vakz. „58–60“	5	24	38,7	39,8	38,9	39,5	—	—	—	—	—	—	1700	1790	—	—
„ 133		5	24	38,9	40,0	38,6	39,0	—	—	—	—	—	—	1770	2140	—	—
„ 134		5	24	38,2	40,0	39,1	39,5	—	—	—	—	—	—	1970	2310	—	—
„ 135		5	24	39,0	39,8	39,3	39,8	—	—	—	—	—	—	2130	2070	—	—
„ 137		5	24	38,8	**40,3**	38,9	39,5	—	—	—	—	—	**40,3**	1210	1225	—	—

$^1/_2$proz. Emulsion aus Kaninchengehirn und -Rückenmark bis auf 58 bis 60° C erwärmt und bei dieser Temperatur $^1/_2$ Std. gehalten und nachher $^1/_2$proz. Karbolsäure zugegeben. — 4) u. 5) Zuletzt habe ich noch Choleravakzine und Divakzine (gegen Cholera und Typhus abdom.) benützt.

Die Resultate dieser Versuche sind in Tab. II niedergelegt; sie zeigen, daß bei Kaninchen und Meerschweinchen während der Wutschutzimpfungen anaphylaktische Erscheinungen sehr oft auftreten (freilich habe ich bei denselben verhältnismäßig sehr große Dosen gebraucht). Hauptsächlich sind es nur Temperatursteigerungen, und ziemlich selten bemerkt man bei ihnen noch unbedeutende Infiltrate. (S. Tab. II, S. 292.)

Die Temperatur steigt sowohl bei Kaninchen, als auch bei Meerschweinchen meistens am 9., 10. und 11. Tage nach Beginn der Injektionen, also nach der 8., 9. und 10. Impfung (selten später). In 1 Falle habe ich periodische Anfälle konstatiert (s. Kan. 95 in Tab. 2).

Ungefähr dieselben Resultate erhält man auch, wenn die Impfungen nur etliche Tage hintereinander dauern, oder Pausen eintreten (s. Tab. III). Bei Kan. 148 zeigten sich periodische Temperatursteigerungen (am 6. und 8. Tage), obwohl nur 3 Tage hintereinander geimpft wurde. Sofortige Reaktionen nach Reinjektionen nach einer Pause von 19—27 Tagen habe ich nicht beobachtet.

Tabelle III.

Tier	Immunisiert	Temperatur während der Impfung		Temperatur am wievielten Tage vom Beginn	An welchem Tage stieg die Temperatur
		Minim.	Maxim.		
Kan. 147	2—1 täg. Mark. 3 Injekt. 3 Tage hintereinander und 1 Inj. nach 20 Tagen. Per 4 ccm	38,9	39,7	am 20. Tage 39,5 „ 21. „ 39,4 „ 22. „ 39,0	.
Kan. 148	dgl.	38,8	40,7	am 20. Tage 39,5 „ 21. „ 39,2 „ 22. „ 39,0	am 6. Tage 40,7 „ 8. „ 40,3
Kan. 129	4 täg. Mark. 2 Injekt., die zweite nach 27 Tagen. Per 4 ccm	39,3	40,0	am 27. Tage 38,7 „ 28. „ 39,8	.
Kan. 131	1 täg. Mark. 3 Injekt., die zweite nach 4 Tagen, die dritte nach 22 Tagen. Per 4 ccm	38,9	39,7	am 22. Tage 39,4 „ 23. „ 39,0	.
Kan. 130	4 täg. Mark. 3 Injekt., nach 4 Tagen jede und die vierte nach 19 Tag. Per 4 ccm	38,7	40,0	am 19. Tage 39,6 „ 20. „ 39,3	.

Während ich Kaninchen mit der gewöhnlichen, nach Kolle zubereiteten Cholera-Vakzine und Divakzine impfte, habe ich bei denselben ebenfalls, und zwar bedeutende, Temperatursteigerungen und in 1 Falle Infiltrate notiert (s. Tab. IV). Bei den Kan. 115 und 114, welche nur einen Kursus dieser Impfungen durchmachten, stieg die Temperatur am 7. Tage beim ersteren und am 7. und 9. Tage beim letzteren. Den Kan. 56 und 57 wurden zuerst 16 Tage nacheinander je 2 ccm ein-

geimpft und nach etlichen Monaten wiederum 24 Tage lang. Beim Kan. 56 stieg die Temperatur am 10. Tage und dann wieder am 21. Tage während des 2. Kursus; es handelte sich also um periodische Anfälle, beim Kan. 57 dagegen war eine Temperatursteigerung am 2. Tage während des 2. Kursus, später aber bestand nur normale Temperatur; hier handelte es sich also um beschleunigte Reaktion.

Tabelle IV.

Tier	Immunisiert			Temp. während der Impf.		Temp. nach Beend. der Impfung		An welchem Tage Temperatursteigerung					Gewicht in g			
													Während der Impfung		Nach der Impfung	
	womit	zu wieviel ccm	wieviel Tage	Minim.	Maxim.	Minim.	Maxim.	2.	7.	9.	10.	21.	anfangs	am Ende	nach wieviel Tagen	Gewicht
Kanin. 56	Chol. vakz.	2	24	39,1	**40,5**	39,1	39,6	—	—	—	**40,5**	**40,4**	1350	1455	19	**1680**
„ 115		4	19	39,0	**40,9**	—	—	—	**40,9**	—	—	—	1480	1415	—	—
„ 57	Di-vakz.	2	24	39,0	**40,9**	39,0	39,5	**40,9**	—	—	—	—	1175	1385	19	**1580**
„ 114		4	24	38,7	**40,4**	—	—	—	**40,2**	**40,4**	—	—	1260	1160	—	—

Während der Serumkrankheit steigt zuerst das Gewicht infolge von Oedemen, danach aber fällt es bedeutend (Pirquet und Schick). Dagegen nahmen die Kaninchen während der Immunisation mit verschiedenen Vakzinen im allgemeinen im Gewicht zu; nur bei 3 von 20 Versuchstieren war das Gewicht zu Beginn der Impfungen etwas höher, als am Ende derselben (s. Tab. II).

Bei Kan. 114 u. 115, welchen Choleravakzine oder Divakzine einverleibt wurde, war das Gewicht nach Beendigung der Immunisation etwas geringer, dagegen nahmen Kan. 56 u. 57, welche 2 Kurse durchmachten, an Gewicht zu. Betrachten wir die Tab. II u. IV genauer, so bemerken wir, daß bei den Versuchstieren, welche mit der Vakzine „58—60“ immunisiert worden waren, die prophylaktischen Erscheinungen bedeutend seltener beobachtet wurden, als bei anderen. Da diese Vakzine, sei sie 1proz. oder $^1/_2$proz., jedenfalls kein geringeres Immunisationsvermögen besitzt, als die übliche, ex tempore hergestellte Emulsion, wie aus meiner Arbeit: „Immunisation gegen Tollwut mit verschiedenen Vakzinen“ zu ersehen ist, so muß man ihr den Vorzug geben, zumal sie auch konserviert und somit auch außerhalb der Pasteurschen Institute gebraucht werden kann, so daß ein jeder Arzt an Ort und Stelle den Gebissenen sofortige Hilfe erweisen kann.

In meiner soeben angegebenen Arbeit habe ich schon gezeigt, daß, je länger gegen Tollwut immunisiert wird, desto bessere Resultate erzielt werden. Als Pasteur seine Wutschutzimpfungen anfing, dauerte die Kur bekanntlich zuerst nur 14 Tage. Da man aber sah, daß der Prozentsatz der Todesfälle sehr hoch ausfiel (einige Prozent), so fing man an, einerseits frischeres Mark zu gebrauchen, andererseits aber den Kursus immer mehr zu verlängern, obwohl auch das Gegenteil versucht wurde (Nitsch — einige Zeit 10 Tage, Ferrán — 5 Tage und dann wieder eine Nachkur von 5 Tagen). In den meisten Pasteur-Instituten wird nun bei schweren Verletzungen nicht weniger als 21—30 Tage geimpft. Die Haustiere werden aber auch jetzt noch meistenteils nur ca. 5mal geimpft, und beobachtet man bei denselben eine große Mortalität. So war es auch in der Pasteurschen Abteilung

des Odessaer Bakteriologischen Institutes, bis ich anfangs 1922 den Kursus für Haustiere bis auf 12—16 Impfungen verlängerte. Von ca. 70 immunisierten Haustieren (darunter sehr schwer am Kopfe von sicher tollwütigen Hunden gebissene) erlag kein einziges der Wut.

Da die bisher angewandten 2—3maligen prophylaktischen Impfungen gegen Cholera oder Typhus keine glänzenden Resultate zeigen, kommt man auf Grund der gemachten Erfahrungen mit den antirabischen Schutzimpfungen unfreiwillig auf den Gedanken, ob man nicht zwecks Erlangung einer besseren und schnelleren Immunität gegen diese Krankheiten eine bedeutend größere Anzahl Impfungen versuchen sollte, und zwar vielleicht nicht jeden 4.—5. Tag, sondern täglich. Wir ersehen aus Tab. 4, daß den Kaninchen in 24 Tagen täglich bis zu 4 ccm dieser Vakzine einverleibt wurden, ohne daß die Versuchstiere erheblichen Schaden litten. Ich habe mir selber 7 Tage hintereinander Choleravakzine (3 Monate alt), zu 1 ccm, also im ganzen 7 ccm, subkutan in die Bauchgegend eingeimpft und fühlte mich, außer allgemeiner Mattigkeit, sonst ziemlich wohl. Die Temperatur betrug am 2. Tage 37,0^{0}, am 3. 37,2^{0}, am 7. 37,0^{0}. An den übrigen Tagen und später war sie normal. Die Lokalreaktion, Schmerzen und Rötung an der Impfstelle, war nach der 1. Injektion am stärksten.

Zusammenfassung.

1. Infiltrate an den Impfstellen während der Schutzimpfungen gegen Tollwut erscheinen gewöhnlich nur nach der 6., 7., 8. und 9. Impfung und sind meistenteils als anaphylaktische Erscheinungen nach Einverleibung fremdartiger Eiweißkörper anzusehen. — 2. Hin und wieder ist die Lokalreaktion mit einer unbedeutenden Temperatursteigerung verbunden. — 3. Dann und wann empfinden die Geimpften einen Juckreiz in der Umgegend der Impfstellen oder klagen über Gelenkschmerzen. — 4. Bei Kaninchen und Meerschweinchen sind anaphylaktische Erscheinungen während der Impfungen mit verschiedenen antirabischen Vakzinen sehr häufig. Hauptsächlich erweisen sie sich durch Temperatursteigerungen; dann und wann beobachtet man bei ihnen aber auch Infiltrate. Die Temperatur stieg bei den Versuchstieren gewöhnlich am 9., 10. und 11. Tage, also nach der 8., 9. und 10. Impfung. Ich habe bei denselben auch periodische Anfälle bemerkt. — 5. Bei Kaninchen, welche längere Zeit täglich Choleravakzine oder Divakzine einverleibt wurde, scheinen anaphylaktische Erscheinungen sehr häufig zu sein. Die Temperatur stieg in unseren Fällen am 7. und 9. Tage. Ich habe aber auch periodische Anfälle und beschleunigte Reaktion beobachten können. — 6. Beim Gebrauche $^{1}/_{2}$proz. oder 1proz. Emulsion aus frischem Kaninchengehirn und -Rückenmark, welche bis auf 58—60^{0} C während 30 Min. erwärmt und der danach $^{1}/_{2}$ Proz. Ac. carbol. zugefügt wurde, sind anaphylaktische Erscheinungen sehr selten. Sie verdient deshalb entschieden den Vorzug vor der ex tempore hergestellten Emulsion, da das Immunisationsvermögen der ersteren jedenfalls nicht geringer ist, sie aber dabei aus dem ganzen

Impfmaterial (Gehirn und Rückenmark) auf die Dauer zubereitet wird und somit außerhalb der Pasteur-Institute von jedem Arzte gebraucht werden kann. — 7. Da sogar tägliche Injektionen der Choleravakzine oder der Divakzine wahrscheinlich während längerer Zeit in größeren Dosen unschädlich sind, würde es vielleicht ratsam sein, um bessere und schnellere Resultate in der Immunisation gegen Cholera oder Typhus zu erzielen, eine bedeutend längere Zeit zu impfen und nicht jeden 4.—5. Tag, sondern möglichst täglich.

Literatur.

Herrmann, O., Pasteursche Impfungen in Odessa, die Methodik und das Wesen derselben. (Prophylaktisch. Med. 1924. Nr. 5/6. [Russisch.] — Ders., Immunisation gegen Tollwut mit verschiedenen Vakzinen. Vortrag auf dem IV. Allukrain. Kongreß d. Bakteriol., Epidemiol. u. Sanitätsärzte am 17.—20. 4. 1924 in Kiew. (Im Druck.) — Lubinski, Die Sterilität des zur Pasteurschen Schutzimpfung verwendeten Kaninchenrückenmarkes. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 88. 1922.) — Nitsch, Bemerkungen über die Pasteursche Methode der Schutzimpfungen gegen Tollwut. (Ibid. Abt. I. Orig. Bd. 43.) — Pirquet u. Schick, Die Serumkrankheit. Wien. 1905. — Remlinger P.. Contribution à l'étude des microbes des moelles rabiques. (Bull. Inst. Past. 1923.) — Simon, G., Ueber die supraintensive Methode der Tollwutschutzimpfung Ferráns. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 65.) — René, Zivi, Sur un mode inédit de préparation des vaccins. (Bull. de l'Inst. Past. 1923.)

Nachdruck verboten.

Immunisation gegen Tollwut mit verschiedenen Vakzinen[1]).

(Aus dem Odessaer Staatsbakteriologischen Institut und dem Poltawer Pasteur-Institut.)

Von Dr. **Otto Herrmann**,
Vorstand des Poltawer Pasteur-Instituts.

Beinahe überall, ungeachtet der verschiedenartigsten antirabischen Schutzimpfungsmethoden, werden bis auf den heutigen Tag Emulsionen gebraucht, die ex tempore aus Kaninchenrückenmark hergestellt werden, wogegen das Gehirn, welches ungefähr doppelt so schwer ist als das Rückenmark, als unbrauchbar betrachtet wird, da es in seinen verschiedenen Teilen von ungleicher Virulenz ist.

Nach Fermi wird zu solcher Rückenmarkemulsion 1 Proz. Ac. carbol. hinzufügt. Marras, der die Vorzüge dieser Emulsion vor der üblichen Pasteurschen aufzählt, gibt unter anderem auch an, daß sie ihre immunisierende Wirkung auch nach etlichen Monaten beibehält, ohne indes entsprechende Beweise zu bringen.

Harris benützt als Impfstoff das Rückenmark sowohl wie das Gehirn, das nach Austrocknung im Vakuum längere Zeit noch brauchbar sein soll. Das Verfahren ist jedoch sehr umständlich; es muß außerdem nach Phillips öfters ein Teil des mit so vieler Mühe hergestellten Materials wegen Unbrauchbarkeit vernichtet werden.

1) Vortrag, gehalten auf dem IV. Allukrain. Kongreß der Bakteriologen, Epidemiologen u. Sanitätsärzte am 17.—20. 4. 1924 in Kiew.

Sehr umständlich ist auch die Bereitung des Trockenimpfstoffs D'Aunoy, welcher frisches Virus unter Zugabe gefrorener Kohlensäure verreibt und bei niedriger Temperatur über Phosphorsäure zu Pulver trocknet.

Phillips stellt sein Wutimpfmaterial auch auf die Dauer her. Er zerreibt zu diesem Zweck das frische Gehirn (das Rückenmark wird dabei vernichtet, da die Virulenz desselben schwächer ist) in Glyzerin und bewahrt dasselbe in dunklen Ampullen in Gegenwart von Ac. pyrogallicum und KOH auf. Dieses Verfahren, obwohl es seiner Einfachheit halber vom Autor empfohlen wird, ist jedoch nicht einfach; es ist zudem kostspielig und nützt außerdem nicht das ganze Material aus.

Meiner Meinung nach muß man den Impfstoff für die Dauer herstellen, damit derselbe auch außerhalb des Pasteur-Instituts gebraucht werden kann; es muß also das ganze Material ausgenützt werden (also Gehirn und Rückenmark), die Herstellung muß einfach und nicht zeitraubend sein und, was die Hauptsache ist, das Immunisationsvermögen muß jedenfalls nicht geringer sein, als bei der üblichen ex tempore hergestellten Emulsion.

Zur Probe habe ich die Versuchstiere subkutan einerseits mit der im Odessaer Bakteriologischen Institut und im Poltawer Pasteur-Institute von mir eingeführten Methodik immunisiert, nach der jede Serie mit 4tägigem Rückenmark anfängt und mit eintägigem endet (also 4, 3, 2, 1, 4, 3, 2, 1 usw.), und andererseits benützte ich verschiedene karbolisierte Gehirn- und Rückenmarkvakzinen, frische und kondensierte Milch, normales Ochsengehirn, Choleravakzine und Divakzine (gegen Cholera und Typh. abdom.). Ich verwandte z. B. Emulsion verschiedener Konzentrationen aus frischem Gehirn und Rückenmark mit Virus fixe sub duram geimpfter Kaninchen in physiologischer Kochsalzlösung, zu welcher ich noch $^1/_2$proz. Acid. carbol. hinzufügte. 1proz. Karbollösung benutzte ich nicht, wie dies Fermi bei seiner Rückenmarkemulsion tut, da die Phenollösung bei weitem nicht indifferent für den Organismus ist; es hemmt z. B., wie ich beobachtet habe, den Wuchs der jungen Kaninchen. Wir nennen diese Vakzine der Kürze halber „$^1/_2$ Proz. Ph.".

Nach René Zivi kann man sterile Mikrobenemulsionen erhalten, wenn man diese auf 5 Min. in den Eisschrank bei einer Temperatur von — 18° C stellt und dann ebensolange bei einer Temperatur von + 16° C hält, was 2—6mal wiederholt wird. Diese Probe habe ich mit dem Wutimpfstoff insofern wiederholt, als ich die Emulsion aus frischem Gehirn und Rückenmark 10 Min. lang bei + 37° C gehalten und dann sofort ebensolange aufs Eis gestellt habe und dieses 3mal hintereinander wiederholte. Danach habe ich $^1/_2$ Proz. Phenol beigefügt. Diese Vakzine hat, was Virulenz anbetraf, sich verhalten, als ob sie einfach nur karbolisiert wäre. Bezeichnen wir diese Vakzine durch „37—0°".

Außerdem habe ich noch folgende Vakzine zur Probe angewandt: Die Emulsion aus frischem Gehirn und Rückenmark habe ich bis auf 58—60° C erwärmt und bei dieser Temperatur die Flüssigkeit 30 Min. gehalten, worauf ich derselben $^1/_2$ Proz. Phenol beifügte. Wir nennen diese Vakzine „58—60°".

Am allerbesten würde es sein, wenn man bei den Experimenten den natürlichen Weg wählen könnte, indem man die Versuchstiere zuerst im. oder sk. infizieren und dann erst auf irgendwelche Weise

immunisieren würde. Bei den Versuchen mit Mäusen könnte man dieses Verfahren vielleicht angehen lassen (Fermi, Marras), obwohl Schindler und Kotzewaloff Mäuse gar nicht so sehr empfänglich gegen s. k. Infektion gefunden haben. Da ich außerdem über weiße Mäuse und Ratten nicht verfügte, so war ich auf Kaninchen und Meerschweinchen angewiesen. Um aber mit diesen Versuchstieren auf dem oben angegebenen Wege zu irgendwelchen gründlichen Schlüssen zu kommen, müßte man außerordentlich viele Tiere opfern. Pasteur und Högyes haben mit ihren Emulsionen solche Versuche an Hunden gemacht, jedoch sind die diesbezüglichen Resultate, wegen der geringen Anzahl der Versuchstiere, nicht recht beweisend.

Es blieb mir also nichts übrig, als die Tiere entweder zuerst s. d. mit Virus fixe oder Straßenvirus zu infizieren und dann zu immunisieren, oder zuerst zu immunisieren und dann erst dieselben subdural mit irgendeinem Virus zu infizieren.

Es stellte sich dabei heraus, daß, wenn man Kaninchen zuerst subkutan mit Virus fixe oder sehr virulentem Straßenvirus infiziert und nachher erst mit irgendwelcher antirabischen Vakzine immunisiert, die Versuchstiere dabei wahrscheinlich nicht mehr zu retten sind.

2 Kaninchen wurden nach der subduralen Infektion mit Virus fixe mit der üblichen ex tempore hergestellten Emulsion immunisiert (nach dem Schema: 4, 3, 2, 1, 4, 3, 2, 1 usw.) und 3 Kaninchen wurden nach der subduralen Infektion mit Straßenvirus mit 2 Proz. Vakzine „37—0" immunisiert. Dabei erlagen der Wut alle Versuchstiere, darunter auch 2 Kontrolltiere, welche nur mit Straßenvirus subdural infiziert wurden (s. Tab. I).

Tabelle I.

Zuerst sd. infiziert und danach von demselben Tage an sk. immunisiert.

Tier	Womit infiziert	Immunisiert			Tod nach wieviel Tagen	Ursache
		womit	zu wieviel ccm	wieviel Tage		
Kan. 48	Virus fixe	4—1täg. Mark	2	5	7	Wut
„ 49	„ „	dgl.	2	5	6	„
„ 108	Straßenvirus	2 Proz. Vakz. „37—0"	2	9	11	„
„ 109	„	dgl.	2	13	15	„
„ 100	„	„	2	15	17	„
„ 106	„	Kontr. (nicht immun)	—	—	11	„
„ 110	„	dgl.	—	—	11	„

Bardach hat nach subduraler Infektion mit Straßenvirus und der nachfolgenden Immunisation von 15 Hunden 9 gesund erhalten, jedoch haben Frisch und Högyes bei solchen Versuchen nur negative Resultate erzielt, ersterer in seinen Versuchen mit Hunden und Kaninchen, letzterer mit Hunden.

Wenn man Kaninchen zuerst immunisiert und dann erst subdural mit Virus fixe infiziert, so kann sogar bei intensiver und lange dauernder Immunisation nur der geringste Teil der Versuchstiere gerettet werden (s. T. II). Das in den Tabellen angegebene Alter der Vakzinen zeigt überall an, wieviel Tage nach der Herstellung sie in Gebrauch kamen. Am Ende der Immunisation waren die Vakzinen somit entsprechend älter.

Tabelle II.

Zuerst sk. immunisiert mit verschiedenen Vakzinen, welche, da nicht anders gesagt, im Dunkeln und bei Zimmertemperatur aufbewahrt wurden, und dann infiziert sd. mit fixem Virus.

Tier	Immunisiert womit	zu wieviel ccm	wieviel Tage	Mark in g	Infiziert nach wieviel Tagen nach der Immunis.	Tod nach wieviel Tagen	Bemerkungen
Kan. 52	2—1tägig Mark	2	16	0,32	5	7	.
„ 53	dgl.	2	16	0,32	6	8	.
„ 27	4—1tägig Mark	4	24	0,96	11	lebt	nach 47 Tagen wieder sd. mit V. f. infiz. Tod nach 7 Tagen.
„ 28	dgl.	4	24	0,96	11	lebt	nach 45 Tagen wieder sd. mit V. f. infiz. Tod nach 7 Tagen.
„ 94	„	4	24	0,96	15	7	.
„ 102	„	4	24	0,96	7	7	.
„ 70	„	2	30	0,6	8	lebt	nach 45 Tagen sd. mit V. f. infiziert. Tod nach 7 Tagen.
„ 71	„	2	30	0,6	18	7	.
„ 104	„	2	30	0,6	13	6	.
„ 15	10 % Vakz. „½ % Ph.“ (3 Wochen alt)	2	25	5,0	1	lebt	nach 155 Tagen sd. mit V. f. infiziert. Tod nach 10 Tagen.
„ 16	dgl.	2	28	5,6	5	13	.
„ 26	10 % Vakz. „½ % Ph.“ (2½ Mon alt, dem indir. Sonnenlichte ausges.)	4	25	10,0	11	9	.
„ 64	1 % Vakz. „½ % Ph.“ (4½ Mon. alt)	2	30	0,6	21	6	.
„ 65	dgl.	2	30	0,6	8	6	.
„ 66	„	2	30	0,6	23	6	.
„ 58	1 % Vakz. „58—60 °“ (2½ Mon. alt)	2	16	0,32	8	7½	.
„ 59	dgl.	2	16	0,32	9	5	.
„ 61	„	2	30	0,6	18	6	.
„ 62	„	2	30	0,6	8	lebt	nach 59 Tagen sd. mit V. f. infiziert. Tod nach 7 Tagen.
„ 63	„	2	30	0,6	21	8	.

Tab. II zeigt, daß von 9 Kaninchen, welche mit der ex tempore hergestellten Emulsion zuerst längere Zeit immunisiert und nachher subdural mit dem fixen Virus infiziert wurden, nur 3 am Leben blieben.

Von 6 Kaninchen, welche mit der Vakzine „½ Proz. Ph.“ in verschiedener Konzentration, Alter etc. immunisiert und dann mit Virus fixe subdural infiziert wurden, blieb nur 1 am Leben und bei 2 war die Inkubationszeit verlängert.

Von 5 Kaninchen, welche zuerst mit der 1proz. Vakzine „58—60 °“ längere Zeit immunisiert und nachher mit Virus fixe subdural infiziert wurden, blieb 1 am Leben und ein anderes starb nach verlängerter Inkubationsperiode.

Von diesen 20 immunisierten Kaninchen blieben nur 5 am Leben, und zwar nur solche, welche nicht weniger als 24—30 Tage hintereinander subkutan geimpft worden waren. Von 4 Kaninchen, welche nur 16 Tage hintereinander immunisiert wurden, starben alle, sogar ohne Verlängerung der Inkubationszeit. Hieraus ist zu ersehen, daß eine 16tägige Impfung bei weitem nicht immer ausreichend ist, und daß man, um bessere Resultate bei der Immunisierung zu erhalten, bei schweren Verletzungen ungefähr 24—30 Tage immunisieren muß. Die lange Dauer der Immunisation scheint sogar von größerer Bedeutung zu sein, als das Quantum des einverleibten Impfstoffes.

Es scheint auch, daß die Vakzinen, welche, im Dunkeln aufbewahrt, von größerem Immunisationsvermögen sind als solche, welche dem indirekten Sonnenlichte ausgesetzt wurden.

Ich behalte mir noch vor, Vakzinen zu prüfen, welche im Eisschrank aufbewahrt wurden, und zu bestimmen, wie lange dieselben die Immunisationskraft beibehalten.

Bedeutend bessere Resultate habe ich erzielt, als ich Kaninchen und Meerschweinchen zuerst mit verschiedenen Vakzinen immunisiert und nachher subdural mit außerordentlich virulentem Straßenvirus infiziert habe (s. Tab. III).

Tabelle III.

Zuerst sk. immunisiert mit verschiedenen Vakzinen, welche im Dunkeln bei Zimmertemperatur aufbewahrt wurden, und nachher sd. mit ein und demselben Straßenvirus infiziert.

Tier	Immunisiert				Infiziert nach wieviel Tagen nach der Immunis.	Tod nach wieviel Tagen	Bemerkungen
	womit	zu wieviel ccm	wieviel Tg.	Mark in g			
Kaninch. 103	4—1tägig Mark	4	24	0.96	16	66	.
Meerschw. 85	dgl,	1	20	0,2	1	lebt	beobachtet ungef. 5 Mon.
Kaninch. 95	1 % Vakz. „37—0°“ (5 Tage alt)	4	24	0,96	9	„	
„ 96	dgl.	4	24	0,96	9	„	
„ 97	„	4	24	0,96	9	„	
„ 101	„	4	24	0,96	9	61	.
Meerschw. 98	1 % Vakz. „58—60°“ (7 Tage alt)	1	16	0,16	16	16	.
„ 99	dgl.	1	16	0,16	20	lebt	beobachtet ungef. 5 Mon.
Kaninch. 111	„	4	24	0,96	19	„	
„ 90	„	4	24	0,96	19	„	
„ 132	1/2 % Vakz. „58—60°“ (4 Wochen alt)	5	24	0,6	10	„	beobachtet 3 1/2 Mon.
„ 133	dgl.	5	24	0,6	10	„	
„ 134	„	5	24	0.6	10	„	
„ 135	„	5	24	0,6	10	„	
Meerschw. 123	Kontr. (nicht immunis.)	—	—	—	13	—	.
Kaninch. 118	dgl.	—	—	—	18	—	.
„ 154	„	—	—	—	15	—	.

Aus Tabelle III ersehen wir, daß 1 Kaninchen und 1 Meerschweinchen mit der üblichen ex tempore hergestellten Emulsion erst immunisiert und dann subdural mit Straßenvirus infiziert wurden. Das Kaninchen erlag der Wut erst nach 66 Tagen, während das Meerschweinchen am Leben blieb. 2 Kontrollkaninchen erlagen nach 15 und 18 Tagen und 1 Kontrollmeerschweinchen nach 13 Tagen.

Von 4 Kaninchen, welche zuerst mit 1proz. Vakzine „37—0⁰“ geimpft und sodann mit Straßenvirus infiziert wurden, erlag nur 1 nach 61 Tagen, die übrigen 3 blieben am Leben.

Von 4 mit der $^1/_2$proz. Vakzine „58—60⁰“ immunisierten und nachher mit Straßenvirus infizierten Kaninchen blieben alle am Leben und von 2 Kaninchen und 2 Meerschweinchen, welche vor der Infektion mit Straßenvirus zuerst mit der 1proz. Vakzine „58—60⁰“ immunisiert wurden, ging nur 1 Meerschweinchen zugrunde.

Somit erlagen der Wut unter diesen Umständen von 14 Versuchstieren nur 3.

Alle diese Vakzinen scheinen ungefähr ein und dasselbe Immunisationsvermögen zu besitzen; da jedoch die ex tempore zubereitete Emulsion nur in speziell eingerichteten Pasteur-Instituten gebraucht werden kann, und dazu nur der geringste Teil des Impfmateriales, nämlich das Rückenmark, verwendet wird, das Gehirn dagegen, welches bedeutend mehr wiegt, vernichtet wird, so glaube ich annehmen zu dürfen, daß die Vakzinen „$^1/_2$ Proz. Ph.“, „37—0⁰“ und „58—60⁰“ vorzuziehen sind, da man sie aus dem ganzen Marke mit geringem Zeitverlust und haltbar zubereiten kann, und sie somit nach allen Städten und Dörfern gesandt werden können. Es wäre somit auch das Zureisen der Gebissenen zu den Pasteur-Instituten ganz überflüssig, da dann ein jeder Arzt an Ort und Stelle nach den der Vakzine beigefügten Instruktionen den von verdächtigen Tieren Gebissenen sofortige Hilfe leisten könnte, was besonders von großer Bedeutung für Schwerverletzte wäre, welche in solchen Fällen doch keine Zeit zu verlieren haben. Unter solchen Umständen könnten die Gebissenen während der Schutzimpfungen auch ihren täglichen Beschäftigungen obliegen.

Den Vorzug vor allen von mir gebrauchten Vakzinen glaube ich entschieden der Vakzine „58—60⁰“ geben zu müssen, da nach derselben, wie aus meiner Arbeit „Anaphylaxie bei antirabischen und anderen Impfungen“ zu ersehen ist, außerdem noch die geringsten anaphylaktischen Beschwerden zu verzeichnen sind.

Um das Immunisationsvermögen der Proteine und der Karbolsäure einigermaßen zu prüfen, habe ich ein Kaninchen mit kondensierter und eins mit frischer Milch geimpft, 2 Kaninchen mit normalem Ochsenhirn und 2 mit 1proz. Karbolsäure in physiologischer Kochsalzlösung. Sodann habe ich sie sub duram mit fixem Virus infiziert. Alle Kaninchen erlagen der Wut ohne Verzögerung, also nach 6—7 Tagen (s. Tab. IV, S. 302).

Außerdem habe ich längere Zeit 1 Kaninchen mit Choleravakzine und 2 Kaninchen mit Divakzine immunisiert und danach mit Straßenvirus infiziert. Auch diese Versuchstiere erlagen der Wut, jedoch mit bedeutender Verlängerung der Inkubationsperiode (s. Tab. IV, S. 302).

Auf Grund der positiven Resultate bei der Immunisation mit den antirabischen Vakzinen und den beinahe negativen Resultaten mit den nicht spezifischen Proteinen scheint es, daß die Wutimpfstoffe, wenn nicht ganz, so doch wenigstens hauptsächlich spezifisch wirken.

Die Karbolsäure scheint ebenfalls kein Immunisationsvermögen zu haben, obwohl Fermi das Gegenteil behauptet. Uebrigens sind in dieser Hinsicht meinerseits zu wenig Versuche gemacht worden, weswegen ich keinen definitiven Schluß daraus ziehen möchte.

Tabelle IV.
Zuerst sk. immunisiert und dann infiziert sub duram.

Tier	Immunisiert				Infiziert		Tod nach wieviel Tagen
	womit	zu wieviel ccm	wieviel Tage	wieviel ccm Flüss.	nach wieviel Tagen	womit	
Kan. 19	Kondens. Milch u. phys. Kochs. āā mit 1 % Karbollösung	1—4	17	43	1	V. f.	7
„ 51	frische Milch	4	16	64	9	V. f.	6
„ 21	frisches normales Ochsengehirn (1% Emuls. in physiol. Kochs. + 1% Phenol.)	1—4	19	56	1	V. f.	7
„ 22	dgl.	1—4	22	68	5	V. f.	7
„ 56	Choleravakzine (4 Mon. alt)	1—2	16 + 24	79	20	Straßenvir.	63
„ 57	Divakzine (4½ Monat alt)	1—2	16 + 24	79	20	„	58
„ 114	„ (1 Monat alt)	4	24	96	2	„	66
„ 17	1 % Karbols. in phys. Kochsalzl.	1—4	20	58	1	V. f.	6
„ 18	dgl.	1—4	26	76	1	V. f.	7

Zusammenfassung.

1. Werden Kaninchen zuerst sub duram mit frischem fixen Virus oder Straßenvirus infiziert, so kann die darauffolgende Immunisation mit irgendwelcher antirabischen Vakzine diese wahrscheinlich nicht mehr retten. — 2. Werden Kaninchen zuerst mit irgendeiner antirabischen Vakzine immunisiert und sodann sub duram mit fixem Virus infiziert, so geht der größte Teil der Versuchstiere dabei an Wut zugrunde. — 3. Werden Kaninchen oder Meerschweinchen zuerst mit antirabischen Vakzinen längere Zeit immunisiert und danach sub duram mit Straßenvirus infiziert, so bleibt bei weitem der größte Teil der Versuchstiere am Leben. — 4. Eine 16 Tage hintereinander erfolgende Immunisation ist nicht immer ausreichend; man sollte daher zur Erzielung besserer Resultate bei schweren Verletzungen ungefähr 24—30 Tage lang immunisieren. — 5. Die Dauer der Immunisation scheint überhaupt wichtiger zu sein als das einverleibte Quantum des Wutimpfstoffes. — 6. Karbolisierte Vakzinen haben den Vorzug vor der ex tempore zubereiteten Emulsion, da das Immunisationsvermögen derselben jedenfalls nicht schwächer ist als das der Emulsion, dagegen erstere aus dem ganzen Material (Gehirn und Rückenmark) hergestellt werden können und haltbar sind, so daß sie auch außerhalb der Pasteur-Institute verwendet werden können. — 7. Von den von mir geprüften Vakzinen glaube ich, der Vakzine „58—60°" (½ Std. auf 58—60° C erwärmt und dann ½proz. Karbolsäure hinzugefügt, wie oben angegeben) den Vorzug geben zu müssen, da dieselbe neben allen anderen beschriebenen Qualitäten die geringsten Beschwerden nach den Impfungen hervorrufen. — 8. Antirabische Vakzinen wirken hauptsächlich spezifisch, nicht aber als gewöhnliche artfremde Proteine.

An dieser Stelle möchte ich dem Dr. B. G. Weinberg meinen Dank ausdrücken, welcher während meiner Abwesenheit eine Zeitlang die Versuchstiere beobachtet hat, und der Assistentin A. M. Fedorenko, welche einen Teil der Versuchstiere für mich trepaniert hat.

Literatur.

D'Aunoy, Antirabic vaccination by means of dessicated virus. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 74. 1923.) — Bardach, J., Sur la vaccination intensive des chiens inoculés de la rage par trépanation. (Ann. l'Instit. Past. 1887.) — Fermi, Cl., Die Empfänglichkeit der Muriden der subkutanen Wutinfektion gegenüber. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 43.) — Ders., Ueber die Verlängerung der Inkubationsdauer des fixen und des Straßenvirus unter verschiedenen Bedingungen. (Ibid. Abt. I. Orig. Bd. 43.) — Högyes, A., Vaccination contre la rage avant et après infection. (Ann. de l'Instit. Past. 1889.) — Ders., Lyssa. (Spez. Pathol. u. Therap. v. Nothnagel. 1897.) — Herrmann, O., Pasteursche Impfungen in Odessa, das Wesen und die Methodik derselben. [Russ.] (Praktitscheskaja Med. 1924. Nr. 5/6. Charkoff.) — Ders., Anaphylaxie bei antirabischen und etlichen anderen Impfungen. (Vortrag, gehalten a. d. IV. Allukrain. Kongreß d. Bakteriol., Epidemiol. u. Sanitätsärzte. 17.—20. 4. 1924. Kiew.) (Im Druck.) — Kotzewaloff, S. Untersuchungen über die Infektiosität des Straßenvirus für weiße Mäuse bei subk. Applikation. (Centralbl. f. Bakter. Abt. I. Orig. Bd. 57.) — Marras, Supériorité du vaccin Fermi sur le vaccin Pasteur. (Ibid. Abt. I. Orig. Bd. 62.) — Phillips, J., Prophylactic treatment for Rabies by means of standardized glycerinated virus. (Journ. of Immunol. Vol. 7. 1922. Nr. 5.) — René Zivi, Sur un mode inédit de préparation des vaccins. (Bull. Instit. Past. 1923.)

Beitrag zum Vorkommen und Verhalten des bakteriophagen Lysins in Abwässern.

[Aus der Abteilung V (Flußverunreinigung, Abwasserbeseitigung und Verwertung) des Hygienischen Staatsinstituts Hamburg (Direktor: Geheimrat Prof. Dr. R. O. Neumann, Abteilungsvorsteher: Dr. O. Kammann).]

Von Dr. **T. Nakashima.**

Schon lange vor der bedeutungsvollen Entdeckung d'Herelles war es bekannt, daß Flußwasser die Eigenschaft hatte, Bakterien, und zwar speziell pathogene Keime, zum Absterben und völligen Verschwinden zu bringen. Ganz besonders auffällig nach dieser Richtung hin sind die Versuche, die der wissenschaftliche Leiter der Londoner Wasserwerke, Houston, angestellt hat, indem er rohes Themsewasser durch einen einfachen Aufspeicherungsprozeß während mehrerer Tage (storage tanks) so entkeimt fand, daß die weitere Behandlung für Trinkwasserzwecke außerordentlich erleichtert wurde. Auch seine Versuche mit pathogenen Keimen, Choleravibrionen und Typhusbakterien, die er den storage tanks künstlich zusetzte, verliefen analog, indem in kürzester Frist eine starke Abnahme und schließlich ein gänzliches Verschwinden dieser Keime festgestellt wurde. Auch an den Wässern anderer Flüsse wurden ähnliche Beobachtungen gemacht, und spätere Untersucher haben gezeigt, daß fast alle Oberflächengewässer, d. h.

Gewässer, die der Verunreinigung mit mehr oder weniger Schmutzstoffen ausgesetzt sind, die Eigenschaft haben, ihre an sich hohe Keimzahl stark zu vermindern und speziell pathogene Keime gänzlich zum Verschwinden zu bringen.

Man führte diese auffällige Eigenschaft auf den sog. Selbstreinigungsprozeß des Wassers zurück, ein Name, der viel schlagwortähnlich gebraucht und mißbraucht worden ist. Zwar war diese Erscheinung als solche längst bekannt und auch der Ungebildetste rechnete ohne weiteres mit dieser Wirkung, da schon die einfache und landläufige Beobachtung, daß ein längere Zeit im Wasser liegender Kadaver nach und nach völlig verschwindet, auf die Annahme einer dem Wasser innewohnenden, verzehrenden und reinigenden Kraft führen mußte. Daraus mag sich dann das im Volksmunde verbreitete Sprichwort hergeleitet haben, daß Schmutzwasser, über 7 Steine geflossen, wieder sauber sei. Durch langwierige Forschertätigkeit wurde indes festgestellt, daß das ganze Phänomen der Selbstreinigung durch viel tiefer liegende Faktoren begründet wird. Die erste Auffassung von der Selbstreinigung durch physikalische, chemische und rein bakteriologische Prozesse hatten sich im Laufe der Zeit wesentlich erweitert, nachdem man erkannt hatte, daß diese genannten Prozesse nur vorbereitende und erleichternde Vorgänge sind, die dem eigentlichen Selbstreinigungsprozeß vorangehen.

Die Bakterien bauen nur bis zu einem gewissen Grade die hochmolekularen Eiweißstoffe, Kohlehydrate und Fette ab. Dann aber treten die höher organisierten Lebewesen an ihre Stelle und das ganze Heer von Protisten, Krebsen, Würmern, Schnecken, Insektenlarven usw. ist es, das die Selbstreinigung bewirkt. Millionen und Milliarden von Tieren und Pflanzen reinigen so in unablässiger Weise das Wasser, wandeln jedes Bröckchen ungelöster Substanz in tierisches Fleisch um und fressen, wie z. B. die Rhizopoden und Infusorien, ungezählte Scharen von Bakterien auf. Die niederen Tiere werden von den höheren gefressen und eine Inkarnation folgt so der anderen bis hinauf zum Fisch und Vogel, die dann wieder über den Menschen den Kreislauf der organnischen Substanz eröffnen müssen. Der Hauptfaktor der Selbstreinigung im Wasser ist also der biologische; er findet sich nicht in voller Wirkung in schnell fließenden Strömen, sondern vorzugsweise in stehenden, flachen und warmen Gewässern, wo der Sauerstoffaustausch mit der Luft am intensivsten ist, und wo zu gleicher Zeit das Maximum tierischen und pflanzlichen Lebens sich findet.

Es war deshalb eine interessante Frage, diesen sog. Selbstreinigungsprozeß in Zusammenhang zu bringen mit dem bakteriophagen Lysin d'Herelles. In einer Untersuchungsreihe hat schon P. C. Flu diese Frage nach gewisser Richtung hin untersucht und ist zu dem Resultat gekommen, daß die Bakteriophagen bei der Selbstreinigung nur eine sehr geringe Bedeutung haben können, da die Reinigung des Wassers auch beim Fehlen der Bakteriophagen zustande kommt, während die Anwesenheit der Bakteriophagen den Prozeß nicht schneller oder vollkommener verlaufen läßt.

Es lag mir nun vor allen Dingen daran, die Frage zu studieren, ob sich ein bakteriophages Lysin mit konstanter Regelmäßigkeit in verschmutzten Oberflächengewässern findet, als deren beste Repräsentanten die städtischen Abwässer zu gelten haben, und wie sich diese Lysine im künstlich eingeleiteten Selbstreinigungsprozeß verhalten,

wie er durch die Behandlung der Abwässer auf intermittierend arbeitenden Bodenfiltern oder künstlich aufgebauten Oxydationskörpern dargestellt wird.

Als Untersuchungsmaterial nahm ich daher Abwässer aus der Sielmündung von Gr. Hamburg, Abwässer einer kleinen Landstadt in der Nähe Hamburgs und Abwässer eines Hamburger Vororts mit eigener Kanalisation und eigener Reinigungsanlage, wo ein ungemein großer Einschlag von industriellen Abwässern stattfand. Dabei leitete mich die Erwägung, daß Abwässer, in welche alle menschlichen und tierischen Abgänge und sonstigen Schmutzstoffe hineingelangen, ein besonders geeignetes Untersuchungsobjekt für das bakteriophage Lysin sein müßten, da bislang vorzugsweise das Lysin aus menschlichen und tierischen Faezes dargestellt wurde. Die Versuchstechnik war die übliche, und zwar erbrachte ich den Nachweis in flüssigen wie auf festen Nährböden. Je 30 ccm Abwasser wurden zuerst durch ein Papierfilter und dann durch ein geprüftes, keimdichtes Berkefeld-Filter filtriert. 1 ccm dieses keimfreien Filtrats wurde zu 9 ccm Bouillon zugesetzt, die mit $^1/_{10}$ Oese Colibazillen aus frischer Agarkultur beimpft wurde. Als Kontrolle diente dieselbe Menge steriler physiolog. Kochsalzlösung anstelle des zugesetzten sterilen Abwassers. Das Resultat war nach 24stdg. Bebrütung bei 37° eine stark hemmende Wirkung auf das Wachstum der Colibakterien. Um dem Einwand zu entgehen, daß diese hemmende Wirkung von den im Abwasser wie immer vorhandenen Chemikalien oder sonstigen wachstumshindernden Stoffen herrühren könnte, wurde das 1. Hemmung verursachende Bouillonröhrchen keimfrei filtriert, 1 ccm davon mit weiteren 9 ccm Bouillon gemischt und mit $^1/_{10}$ Oese Coli beimpft. Nach 24stdg. Bebrütung bei 37° wurde dieselbe hemmende Wirkung festgestellt. Dieser Vorgang wurde noch mehrere Male wiederholt und stets dasselbe Resultat erzielt, so daß von einer hemmenden Wirkung etwaiger im Abwasser vorhandener greifbarer Substanzen nicht mehr gesprochen werden kann. Der Lysinnachweis auf festen Nährböden wurde so erbracht, daß nach Mischung der Bouillonnährflüssigkeit mit dem keimfreien Abwasser und Zusatz von $^1/_{10}$ Oese Colibakterien je 0,2 ccm dieses Gemisches auf Agarplatten ausgestrichen wurde, die nach 24stdg. Bebrütung bei 37° nach der bekannten Methode von d'Herelle auf ster. Löcher (tâches vierges) untersucht wurden.

Bei der regelmäßigen Untersuchung der oben genannten 3 Abwasserarten stellte sich nun übereinstimmend heraus, daß in dem Abwasser aus der Sielmündung Gr. Hamburgs und in dem Abwasser des kleinen Landstädtchens stets ein bakteriophages Lysin von gleicher Stärke für den benutzten Colistamm festzustellen war, so daß normales häusliches Abwasser eine ausgezeichnete Ursubstanz für die Darstellung eines Lysins von gleicher Stärke und Wirkung ergibt. Anders verhielt sich dagegen das Abwasser aus dem Hamburger Vorort, das zu mehr als 50 Proz. aus industriellen Abwässern bestand, die aus Lederfabriken, chemischen Fabriken, Metallwerken und namentlich Fischmehlfabriken herrührten. Hier wurde das bakteriophage Lysin nicht mit derselben Regelmäßigkeit angetroffen und dann auch in weit geringerer Stärke. Zweifellos ist dieser Befund auf die stark schädigend wirkenden Substanzen der industriellen Fabrikabwässer zurückzuführen, die zwar den Keimgehalt des Abwassers nicht wesentlich zu beeinflussen vermochten, da er dieselbe Höhe erreichte wie bei den normalen häus-

lichen Abwässern, die aber einen starken Einfluß auf das Vorhandensein und die Wirkung des bakteriophagen Lysins ausüben mußten. Auch für andere Bakterienarten, wie Paratyphus usw., wurde ein Lysin in den betreffenden Abwasserarten mit großer Regelmäßigkeit festgestellt, dagegen gelang es nicht, ein Lysin für Wasservibrionen nachzuweisen.

Von besonderem Interesse mußte es noch sein, wie sich diese in den häuslichen Abwässern mit konstanter Regelmäßigkeit nachzuweisenden Lysine bei dem biologischen Abbauprozeß der organischen Substanzen des Abwassers auf intermittierend arbeitenden Bodenfiltern oder auf künstlich aufgebauten Oxydationskörpern nach Art der bekannten Sprinkler verhalten. Zu diesem Zwecke wurde ein Sandfilter und ein Tropfkörper aus Schlacke mehrere Monate hindurch regelmäßig mit normalem häuslichen Abwasser beschickt. Das Sandfilter erhielt jeden 3. Tag eine Abwassermenge, die seiner Wasserkapazität entsprach, und dann eine zweitägige Ruhepause zur Regenerierung, während der Tropfkörper mit derselben Abwassermenge in kontinuierlichem Betriebe beschickt wurde. Nachdem beide Filter ihren „Reifezustand" erreicht hatten, war das vorher stark fäulnisfähige Abwasser durch den biologischen Reinigungsprozeß so umgearbeitet, daß es keine fäulnisfähigen organischen Substanzen mehr enthielt. Aus dem organisch gebundenen Stickstoff waren Nitrate gebildet, aus dem organisch gebundenen Schwefel schwefelsaure Salze und aus dem organisch gebundenen Kohlenstoff Kohlensäure resp. kohlensaure Salze. Die Abflüsse waren demnach durch den intensiv wirkenden Abbauprozeß so verändert worden, daß sie fäulnisunfähig waren. Die nachfolgenden beiden Tabellen geben die chemischen Werte für das zugeführte Rohwasser und für die Abflüsse aus den beiden Filtern an.

Sandfilter (mg im L.)

	Chlor	Oxyd.	Abnahme	NH_3	Abnahme	N_2O_5	Fäulnis
1. Rohwasser	200,0	172,3	—	42,8	—	—	+
Abfluß	200,0	75,8	56,0 Proz.	4,8	88,7 Proz.	128,0	—
2. Rohwasser	210	141,2	—	42,8	—	—	+
Abfluß	205	61,2	56,3 Proz.	2,4	94,4 Proz.	103	—

Tropfkörper (mg im L.).

	Chlor	Oxyd.	Abnahme	NH_3	Abnahme	N_2O_5	Fäulnis
1. Rohwasser	185,0	158,0	—	35,2	—	—	+
Abfluß	185,0	39.5	75 Proz.	14,1	60 Proz.	68,0	—
2. Rohwasser	165,0	163,0	—	40,4	—	—	+
Abfluß	165,0	42,4	75 Proz.	7,4	82,3 Proz.	100,0	—

Nachdem nun das Sandfilter und der Oxydationskörper ihren höchsten Leistungsgrad erreicht hatten, wie er durch die beiden obigen Tabellen charakterisiert wird, wurden die zugeführten Rohwässer und die korrespondierenden Abflüsse nach den oben angeführten beiden Methoden auf bakteriophage Lysine untersucht. Es stellte sich mit Regelmäßigkeit heraus, daß der biologische Umarbeitungsprozeß sowohl im Sandfilter wie im Tropfkörper keinerlei schädigende Wirkung auf das Lysin hatte ausüben können, da es in den Abflüssen mit demselben Wirkungsgrade und derselben Wirkungsweite wieder aufgefunden werden konnte. Dieses Resultat war nicht ohne weiteres vorauszusehen, denn es ist bekannt, daß die niedere Organismenwelt des zugeführten Rohwassers durch die physikalisch-chemische und biologische Umarbeitung in den Filterkörpern von Grund auf verändert wird. Da nun die bakteriophagen Lysine in unverminderter Stärke und

unveränderter Wirkungsbreite diesen Reinigungsprozeß überstehen, ist anzunehmen, daß auch sie einen gewissen Anteil an der Reinigung der mit organischen Schmutzstoffen beladenen Rohwässer haben, indem sie die Keime vernichten helfen, die für eine biologische Umarbeitung weniger in Betracht kommen. Inwieweit die Lysine bei der Reinigung normaler häuslicher Abwässer auf Filterkörpern tätig sind, müssen weitere Untersuchungen auf diesem Gebiete ergeben.

Ferner wurden mehrere Versuche über das Verhalten und die Eigenschaften der aus normalem häuslichen Abwasser gewonnenen Colilysine angestellt. D'Herelle hält bekanntlich den Bakteriophagen für ein ultravisibles Virus, welches die Bakterien infiziert und vernichtet, und nennt es deshalb „Bacteriophagum intestinale". Gegen diese Anschauung hat zuerst Kabeshima Stellung genommen, indem er physikalisch-chemische Versuche veröffentlichte, die gegen die Annahme eines Lebewesens sprachen. Er ist der Ansicht, daß durch katalytische Wirkung ein Proferment in den Bakterien ausgelöst wird, das seinerseits auf die Bakterien einwirken kann. Andere Untersucher stellen sich die Lysine als Aktivatoren vor, welche in sich ruhende Fermente zur Tätigkeit anreizen sollen und dadurch den autolytischen Prozeß herbeiführen können. Wenn auch die Ansichten über das bakteriophage Lysin noch weit auseinandergehen, so gibt es doch gewisse Merkmale, die trotz aller Divergenzen einander recht nahestehen, so daß man nach den heute vorliegenden Untersuchungen annehmen kann, daß es sich um eine fermentartige, stoffliche oder an Stoffe (Eiweißkörper) gebundene Substanz handelt.

Meine Versuche erstreckten sich demnach nach der Richtung hin, ob sich das Lysin in seinen Eigenschaften und Wirkungen den bisher gut bekannten Fermenten, wie Pepsin und Trypsin, nähert.

Die heutige Auffassung der Fermente als Katalysatoren ist wohl allgemein angenommen. Ein Ferment ist demnach eine Substanz, die von der lebenden Zelle erzeugt wird und imstande ist, chemische Prozesse, die auch von selbst, aber mit kaum meßbarer Geschwindigkeit verlaufen würden, auszulösen und in beschleunigter Weise zu Ende zu führen. Von den Fermenten als solchen wissen wir recht wenig, weil wir keine charakteristischen Reaktionen der Fermentstoffe kennen. Wir müssen uns daher bislang auf die Fermentwirkungen beschränken, die mit den üblichen Methoden der Chemie und Physik gemessen werden können, und auf die Aenderungseinwirkungen anderer Substanzen auf die Fermente.

Als Untersuchungsobjekt diente das Colilysin aus normalem städtischen Abwasser, das nach einer Bebrütungszeit von 6 Std. bei 37° das Optimum seiner Wirkung erreicht hatte. Dieses Lysin wurde für die folgenden Versuche benutzt.

Nach den Untersuchungen vieler Autoren verhält sich das Lysin gegen Erhitzung außerordentlich verschieden, so daß man annehmen muß, daß die Resistenz gegen Erhitzung bei den einzelnen Lysinen eine verschiedene ist. Während Twort schon bei 60° eine Zerstörung seines gewonnenen Lysins festgestellt hat, konnte Hauduroy eine Abtötung des wirksamen Agens erst bei 102° erzielen. Als feststehendes Faktum kann man ansehen, daß eine Abschwächung des Lysins bei Temperaturen zwischen 70—80° erreicht wird, eine Vernichtung aber noch nicht durch 100°. Das aus dem Abwasser gewonnene Colilysin wurde schon durch eine 5 Min. lange Erhitzung auf 100° gänzlich

inaktiviert. Eine 1/2stdg. Erhitzung auf 70° schädigte es nicht, da die Aktivität auf voller Höhe erhalten geblieben war. Erst eine 1/2stdg. Erhitzung auf 80° hatte eine Abschwächung der lytischen Wirkung zur Folge. Die sich an diese Inaktivierungsversuche anschließenden Versuche über eine Reaktivierung des inaktivierten Lysins mit lipoidreichen Stoffen verliefen ergebnislos. Auch die Filtration durch ein frisches, nicht gebrauchtes Berkefeldfilter brachte, entgegen den Angaben verschiedener Autoren, keine Reaktivierung hervor. Durch Kältewirkung wird das Colilysin ebenfalls nicht angegriffen. Das hochwirksame Lysin wurde während zweier Tage in einer Kältemischung von weniger als minus 10° C gehalten mit dem Ergebnis, daß das Lysin nicht einmal abgeschwächt war.

Die Feststellung von Gildemeister, daß die Lysinwirkung durch eine Sauerstoffentziehung nicht beeinflußt wird, konnte bestätigt werden durch Versuche, das Colilysin auch aus Wasser des Emscherbrunnenfaulraumes einer städtischen Abwasserreinigungsanlage zu gewinnen. Dieses Faulraumwasser ist durch die ständigen Reduktionsvorgänge absolut sauerstoffrei; trotzdem gelang es mit großer Regelmäßigkeit, ebenso wie im zugehörigen Rohwasser, das Colilysin in gleicher Stärke und Wirksamkeit zu erhalten.

Auch gegen chemische Mittel ist von den verschiedenen Untersuchern eine ganz verschiedene Widerstandsfähigkeit des Lysins nachgewiesen worden, so daß dieses Verhalten als für die Vielheit der bakteriophagen Lysine sprechend gedeutet wird. Das Lysin ist säureempfindlich; zur Erzielung einer Optimalwirkung bedarf es einer gewissen Alkaleszenz des Nährbodens von pH 8,0—8,5. Meine Versuche mit den Einwirkungen von $n/_{20}$ Salzsäure und $n/_{20}$ Natronlauge auf das Colilysin hatten das Ergebnis, daß eine 24stünd. Einwirkung bei gewöhnlicher Temperatur keine völlige Zerstörung verursachte, sondern nur eine Abschwächung. Ließ ich dagegen diese chemischen Substanzen im Brutschrank bei 37° auf das Lysin einwirken, so wurde die lytische Wirkung vollständig vernichtet.

Die Frage, ob das Lysin zu den ätherlöslichen Substanzen gehört oder durch eine Aethereinwirkung geschädigt wird, [illegible] negativen Sinne beantwortet worden; weder ging auch nur eine [illegible]schen Wirkung in den Aetherextrakt über, noch wurde das Lysin irgendwie geschädigt in der ursprünglich ätherextrahierten Flüssigkeit. Die Literaturangaben über die Aetherlöslichkeit des Lysins sind ebenfalls schwankend; während d'Herelle die Frage der Löslichkeit oder Unlöslichkeit offen läßt, vertritt Kabeshima den Standpunkt, daß es in Aether löslich ist, während de Poorter und Maisin die Unlöslichkeit in Aether betonen. Das mir zur Verfügung stehende Colilysin aus Abwasser ist weder durch Aetherextraktion noch durch Aether beeinflußbar. Etwas anders verlief der analoge Versuch mit Alkohol. Es ist bekannt, daß Fermente aus Lösungen durch einen 8—10fachen Ueberschuß an Alkohol vollständig niedergeschlagen werden können und in dem neu gewonnenen Trockenrückstand ihre Wirkung voll aufrecht erhalten. Ich übertrug diesen Versuch auf das Abwassercolilysin, indem ich 1 Raumteil des Lysins mit 8 Raumteilen 96 proz. Alkohol mischte und 24 Std. im Eisschrank stehen ließ. Der entstandene Niederschlag wurde vom Alkohol befreit, wieder in Lösung gebracht und auf Lyse untersucht. Das Ergebnis war stark positiv und gegenüber der ursprünglichen Lysinwirkung kaum verändert. Das

Alkoholfiltrat wurde bei 20 mm Druck und einem Siedepunkt von unter 37° vom Alkohol befreit und ergab ebenfalls nach Wiederauflösung ein positives Resultat. Es ist nicht ausgeschlossen, daß noch Spuren des feinsten Alkoholniederschlages, die mechanisch nicht entfernt werden konnten, in das Filtrat übergegangen sind und diese Wirkung hervorgerufen haben. Jedenfalls steht fest, daß die Wirkung fast quantitativ in den Alkoholniederschlag übergeht. Dieses Ergebnis steht im strikten Gegensatz zu der Festsellung d'Herelles, der die Beobachtung gemacht hat, daß sein Lysin durch die 10fache Menge Alkohol während einer Einwirkungszeit von 48 Std. vollständig zerstört wurde. Dagegen haben Kabeshima und Watanabe eine Resistenz gegen 96proz. Alkohol festgestellt.

Aus der Literatur ist bekannt, daß die Lysinbildung befördert wird durch Fermente, Leukozyten, Pankreatin, Papayotin, Trypsin und andere. Diese Stoffe wirken nur begünstigend, nicht an sich schon auflösend, wie Seiffert für das Trypsin nachgewiesen hat. Meine Untersuchungen nach dieser Richtung hin decken sich mit diesen Befunden. Die Einwirkung von Papayotin, Pepsin und Trypsin konnte keine Abschwächung oder Vernichtung des Lysins hervorrufen; im Gegenteil wurde eine deutlich wahrnehmbare Begünstigung erzielt. Die Frage, ob das Lysin an sich fermentative Wirkung entfalten kann, ist nach meinen Untersuchungen ebenfalls im negativen Sinne ausgefallen. Ich ließ das Lysin auf Kasein und andere Eiweißstoffe einwirken und kam zu dem Ergebnis, daß die eiweißspaltende Kraft des Lysins nur identisch war mit der im geringen Grade festgestellten eiweißspaltenden Kraft des zugehörigen Colifiltrats. Diese Versuche wurden mehrfach ausgeführt, wobei die Menge des noch vorhandenen ausfällbaren Kaseinstickstoffs als Maßstab benutzt wurde.

Die Resultate der vorliegenden Untersuchungen sind kurz zusammengefaßt: In normalem städtischen Abwasser ist mit großer Regelmäßigkeit ein Colilysin vorhanden, das im Abwasser mit starkem industriellen Einschlag fehlt oder nur selten auftritt. Das Lysin verträgt Sauerstoffentziehung (Faulkammerbehandlung) und wird durch den biologischen Reinigungsprozeß der Abwässer nicht verändert. Es ist thermolabil, gegen Säuren und Alkalien empfindlich, unempfindlich gegen Kälte und Fermentwirkung, nicht extrahierbar mit Aether, aber ausfällbar mit Alkohol. Eine künstliche Fermenteinwirkung vermag es nicht zu zerstören, noch entfaltet es selber bekannte Fermentwirkungen.

Beobachtungen über Culiciden, nebst Bemerkungen über Tabaniden, Simuliden und Chironomiden.

[Hygienisch-parasitologisches Institut der Universität Lausanne.]

Von **B. Galli-Valerio.**

1. Culiciden (Ende Oktober 1923 bis Ende Oktober 1924).

a) Beobachtungen in den verschiedenen Jahreszeiten: Am 17. 11. 1923 (Lufttemp. + 10°, Wassertemp. + 11°) wimmelten

Pfützen von Vidy, wo ich am 17. 10. keine Culicidenlarven gefunden hatte, von jungen Larven von Th. annulata. Sie stammten sehr wahrscheinlich von Eiern, die in feuchte Vertiefungen des Bodens gelegt worden waren und nach Regen und bei günstiger Temperatur sich entwickelt hatten. In anderen Pfützen waren die Puppen von Th. annulata zahlreich und mit kleinen und mittleren Larven von A. bifurcatus vermischt. Während des ganzen Winters waren die Larven von C. nemorosus, Th. annulata und A. bifurcatus zahlreich. Auch einige Larven von A. maculipennis haben überwintert. Diese Larven haben, ins Laboratorium gesetzt (Lufttemp. + 17° bis + 18°) die erste Puppe von Th. annulata am 1. 4. 1924 entwickelt; sie hat am 8. 4. ein Weibchen ergeben. Aus einer anderen Puppe hat sich am 19. 4. ein Weibchen von C. nemorosus entwickelt. Die Larven von A. bifurcatus haben die 1. Puppe am 10. 4. ergeben, und am 12. 4. hat sich ein Weibchen entwickelt, was zeigt, wie ich schon bemerkt hatte[1]), daß überwinternde Larven von Culiciden auch in günstiger Temperatur sich nicht so schnell entwickeln wie Sommerlarven.

In Vidy selbst haben sich die ersten Puppen von Culiciden (C. nemorosus) am 14. 6. entwickelt (Luft- und Wassertemp. + 13°), und an diesem Tage habe ich auch sehr junge Larven von Culiciden gefunden. Die ersten jungen Larven von A. bifurcatus und A. maculipennis sind am 16. 6. erschienen (Lufttemp. + 24°, Wassertemp. + 22°). Im Mai und Juni waren in Baumhöhlungen von Sauvabelin die Larven von C. ornata sehr zahlreich, sehr spärlich aber die von A. nigripes. Im August und September waren Larven und Puppen von C. pipiens in Vidy sehr zahlreich, und am 1. 9. (Lufttemp. + 21°, Wassertemp. + 19°) auch viele Larven von A. bifurcatus und A. maculipennis. Im September hat A. bifurcatus eine neue Eiablage gemacht, und noch am 16. 10. (Lufttemp. + 14°, Wassertemp. + 12°) habe ich sehr viele kleine Larven dieser Art gefunden. Am 16. 10. waren die Larven und Puppen von Th. annulata auch sehr zahlreich, sehr selten aber diejenigen von A. maculipennis.

b) Beobachtungen über Brutplätze der Culiciden: Die starke Wirkung von Wasserpflanzen auf den Brutplätzen der Culiciden war sehr charakteristisch in dem See des Parkes Bourget (Vidy): Wo das Wasser ganz mit Konferven (Oedogonieen) und Lemna palustris bedeckt war, fanden sich sehr zerstreut einige Larven von Culicinen, aber gar keine von Anophelinen. Dagegen waren in der Nähe, wo das Wasser von diesen Pflanzen ganz frei war, die Larven von A. bifurcatus und speziell von A. maculipennis sehr zahlreich.

Daß die verschiedenen Arten von Culiciden sehr oft ganz verschiedene Gewässer vorziehen, zeigen sehr gut die Beobachtungen in Vidy: In einigen Pfützen findet man immer Larven von A. bifurcatus, in anderen solche von Th. annulata und C. nemorosus; C. pipiens kommt nur in einigen Pfützen und Regentonnen vor. A. maculipennis ist jetzt sehr zahlreich in dem See vom Park Bourget, wo A. bifurcatus seltener ist.

c) Beobachtungen über die Biologie und Verbreitung der Culiciden: Daß Weibchen von Culiciden absolut ohne Nahrung

[1]) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 63. 1912. S. 222, und Bd. 67, 1913, S. 472.

und nur mit etwas Wasser im Winter sehr lange leben können, zeigt folgender Fall: Ein Weibchen von Th. annulata, das im November 1923 in ein Gefäß mit etwas Wasser bei + 16° bis + 18° gesetzt war, hat bis zum 4. April gelebt. — Am Abend des 20. 7. flogen auf einem Wege in der Rottenebene keine Mücken; wenn man etwa 1 m von der Straße sich entfernte und in das Gestrüpp ging, wurde man von Schwärmen von C. pipiens angegriffen. Diese Schwärme verfolgten mich dann auf die Straße, wurden aber mehr und mehr seltener, um nach etwa 100 m ganz zu verschwinden. Dies zeigt immer mehr, daß die Culiciden sich nicht gern von dem Zentrum ihrer Entwicklung entfernen, und daß bei der Bekämpfung der Schnakenplage vor allem die kleinen Brutplätze in der Nähe der Wohnungen zerstört werden müssen.

Vom 11. 8. ab habe ich in dem Grubensee keine Puppen und Larven von Aëdes gallii gefunden, wohl aber flogen und stachen in der Sonne die Weibchen dieser Art. Sie waren aber nicht so zahlreich wie im Sommer 1923, sehr wahrscheinlich wegen des schlechten kalten Wetters dieses Jahres.

Prof. W. H. Hoffmann (Habana) war so liebenswürdig, mir Eier von Steg. fasciata, auf Fließpapier oder Watte fixiert, in Briefen zu schicken. Die Eier waren am 28. 11. 1923 von Kuba abgeschickt und kamen in Lausanne am 18. 12. an, wo sie sofort in Wasser bei 25° gesetzt wurden. Die 1. Entwicklung der Larven fand am 31. 12., der Puppen am 4. 1. und der Imagines am 6. 1. statt. Ein Weibchen hat mich am 16., 18. und 22. 1. bei 17—18° gestochen und ging in der Nacht vom 23. zum 24. 1. zugrunde. Eier, die von Kuba am 1. 8. abgeschickt, in Lausanne am 25. 8. angekommen und sofort ins Wasser bei 25° gesetzt worden waren, gaben die 1. Entwicklung von Larven am 7. 9. Die während eines Monates ganz eingetrockneten Eier von St. fasciata konnten sich noch entwickeln. Das zeigt immer mehr, wie leicht es ist, die St. fasciata zu verbreiten, deren Imagines sehr leicht Drahtnetze mit Maschen von $^3/_4$ mm durchdringen. Drahtnetze mit Maschen von $1—1^1/_2$ mm, die im allgemeinen gegen Mücken empfohlen werden, können daher nicht gegen Stegomyien schützen. Ich habe Stegomyien gesehen, die sehr leicht Glasröhrchen von $1^1/_2$ mm Durchmesser durchdringen.

d) Nochmals zur Frage der misanthropen Anophelen: Was ich über diese Frage in dieser Zeitschrift geschrieben habe[1]), wurde von Edm. und Et. Sergent, Parrot, Foly, Sénevet und Catanei in ihren Berichten über die Malariabekämpfung in Algerien 1920, 1921 und 1922 bestätigt[2]): „Alle Untersuchungen, die wir angestellt haben über die Nützlichkeit der Haustiere als Schutz gegen die Anophelen, stehen im Widerspruch mit der Theorie der Malariabekämpfung durch Haustiere." Sie zitieren Fälle von Pachtgütern, wo das Vieh von 3—4 bis 300 Stück sich vermehrt hat und wo die Malaria stärker aufgetreten ist, und schließen fast mit meinem Satze: „Wenn die Anophelen in die Ställe gehen, so geschieht das nur, weil sie hier mehr als in den Wohnungen der Menschen günstige Verhältnisse finden: Feuchtigkeit, Dunkelheit. In den Ställen stechen sie mehr das Vieh, nur weil das ganz nahe steht, aber eine große Menge geht in die Nachbarschaft, um Menschen zu stechen."

1) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 92. 1924. S. 103.
2) Ann. de l'Inst. Pasteur. 1924. p. 777.

Nochmals habe ich in diesem Jahre bemerkt, daß Culiciden, die in Zonen leben, wo die Menschen sehr selten sind, mit großer Lust diese angreifen, wenn diese da erscheinen.

Die Theorie des Viehschutzes gegen die Malaria ist daher für die Prophylaxis dieser Krankheit sehr gefährlich.

e) Bekämpfung der Culiciden. Die Nachlässigkeit der Menschen ist eine der wichtigsten Ursachen der Culicidenplage. Die Menschen können sehr gute Resultate durch die Bekämpfung der Schnaken erzielen, wie Dr. Lardy in Bevaix (Neuenburgersee) bewiesen hat. Er schreibt mir: „....die Bekämpfung hat sehr gute Resultate ergeben. Ich könnte auch sagen vollkommene Resultate, denn wir können jetzt in unseren Häusern mit Lampen bei offenen Fenstern leben, und nur hier und da zeigt sich eine Mücke."

Einige Male hat man mir geschrieben, daß die Culiciden nach der Bekämpfung aus den Häusern verschwunden waren, aber noch zahlreich im Garten waren; doch waren diese Mücken des Gartens keine Culiciden, sondern Culicoides pulicaris.

Wie wichtig der Kampf gegen die Culiciden auch in Gegenden ist, wo die Malaria verschwunden ist, zeigt noch ein Fall dieser Krankheit, den Lardy 1919 in Bevaix beobachtet hat bei einem Manne, der nie den Kanton Neuenburg verlassen hatte, aber in Verbindung mit malariakranken französischen Internierten gestanden hatte.

Im Sommer 1918 habe ich bemerkt, daß da, wo viele Pfützen eingetrocknet sind, die verbleibenden die Culiciden in großen Mengen anlocken. Es wäre daher möglich, in diesen Tümpeln mit Petroleum sehr viele Larven und Puppen zu vernichten. Ich hatte solche anlockende Tümpel für die Zerstörung der Mücken schon vorgeschlagen[1]), da sie sehr gute Resultate geben können. Diese Methode scheint Hargreaves in Campo Cimino (Italien) angewandt zu haben[2]).

2. Tabaniden.

Im Sommer 1924 waren die Bremsen auf den Alpenwiesen so zahlreich wie im Sommer 1921. Die ersten Bremsen habe ich auf Alpenwiesen in Wallis in Bovinette (1763 m) und Bovine (1972 m) am 7. 6. gefunden. Tabanus aterrimus hat mich bis 1923 m (Paré blanche, Wallis), Chrysops coecutiens bis 1592 m (La Brûlée, Wallis) angegriffen. Prof. Bezzi, der so gut war, einige Tabaniden. die mich auf Paré blanche und Pointe de la grande chaux (1914 m, Wallis) angegriffen hatten, zu untersuchen, hat die folgenden Arten, alles Weibchen, gefunden: Paré blanche: T. aterrimus Meig., T. apricus Meig., T. sudeticus Zell, T. bromius L.; Pointe de la grand chaux: T. apricus Meig., T. sudeticus L., T. bromius L., T. glaucopis Meig.

Noch am 18. 9. habe ich eine Bremse im Arpettatal (1647 m, Wallis) gefunden.

Im allgemeinen wurde ich von den Bremsen in der Sonne angegriffen, und zwar auch bei starkem Winde, doch bin ich auch nach Sonnenuntergang speziell von H. pluvialis gestochen worden.

3. Simuliden und Chironomiden.

Simulium gallii war im Sommer 1924 sehr zahlreich auf den Bergen. Die ersten Schwärme habe ich am 7. 6. in Bovine ge-

1) Korrespondenzbl. f. Schweiz. Aerzte 1919. Nr. 19.
2) Ref. in Annali d'Ig. Vol. 34. 1924. p. 363.

sehen. Diese Art habe ich auch in Wallis an folgenden neuen Orten gefunden:

Im Unterwallis: Grat von Lanchettes	1568—1694 m
Pertuis von Savalénaz	1721 m
Sex von Savalénaz	1637 „
Grat von Paré blanche	1672 „
Tour du Don	2001 „
Gramont	2175 „
Im Gebiet von St. Bernhard:	
Spitze der Breya	2378 „
Lac du Druz	2700 „
Grat von Chevrettes	2645 „
Grat von Seingles	2700 „

Diese Art hat mich auch in diesem Jahre, nachdem ich sie mit Probiergläsern auf meinen Arm gesetzt hatte, nicht gestochen. Im Käfige hat sie 1, 2, 4 Tage gelebt, ohne zu fressen. Die Schwärme von S. gallii verschwinden sofort, wenn der Wind sich erhebt. Noch am 9. 11. 1924 habe ich diese Art 1512 m hoch in Wallis gefunden (+ 17°).

Einen interessanten Einfall von Chironomiden hatte ich zu sehen Gelegenheit am Bortersee, 2700 m, Turtmanntal, am 16. 8. 1924. Als ich an den Ufern dieses Sees war, fielen plötzlich große Schwärme von sehr kleinen, schwarzen Chironomiden auf mich ein, so daß in einigen Minuten meine Kleider, Hände, mein Kopf und mein Proviant ganz bedeckt von ihnen war, doch ohne zu stechen. Nach Herrn Edwards, vom British Museum, der diese Chironomiden untersucht hat, hat es sich um Corynoneura innupta Edw. gehandelt, eine Art, die er im Juli 1924 in England gefunden und beschrieben hat[1]). In den Schwärmen wurden Weibchen und Männchen gefunden. Wichtig für die geographische Verbreitung der Chironomiden ist es, daß diese bis jetzt nur in England gefundene Art auch 2700 m hoch in den Walliseralpen so zahlreich ist.

November 1924.

Nachdruck verboten.

Ueber den Einfluss verschiedener Farbstoffe auf das Bakterienwachstum.

[Aus dem bakteriologischen Laboratorium der Escuela de Salubridad in Mexico.]

Von Dr. **Ernst Oesterlin.**

Von jeher haben die Beziehungen zwischen Farbstoffen und Bakterien die Forschung interessiert, und zwar von den verschiedensten Gesichtspunkten aus. Vor allem hoffte man, durch die Färbung Aufschluß über die physikalischen und chemischen Qualitäten der Bakterien zu erlangen. Hier bot besonders die Gram-Färbung eine Fülle von Problemen, von denen viele allerdings noch ihrer Lösung harren. Ferner bediente man sich des Zusatzes von Farbstoffen zum Nährboden, teils um chemische Reaktionen wie Säurebildung sichtbar zu machen (Endo, Drigalski), teils um durch gewisse Farbstoffe, wie Malachitgrün, eine elektive Hemmung bei der Kultur von Bakteriengemengen zu erzielen.

1) The Entomolog. Monthly Magazine. Vol. 60.

Von allen diesen Gesichtspunkten aus erscheinen die Studien Churchmans von besonderem Interesse. Churchman unterscheidet zwischen Bakterizidie und Bakteriostase, oder, wie er es in einer späteren Arbeit nennt, innerer und äußerer Bakteriostase. Unter der ersteren versteht er die Einwirkung der Farblösung auf die Bakterien in einer mit Farbzusatz versehenen Kochsalzaufschwemmung; hingegen wird die äußere Bakteriostase dadurch bewirkt, daß man den Farbstoff direkt zum Nährboden (Agar, Bouillon oder Gelatine) hinzusetzt.

Churchman studierte vor allem die Wirkung des Gentianavioletts und fand, daß dieses, dem Agar zugesetzt, das Wachstum der Gram-positiven Sporenträger (Anthrax, Megatherium) hemmte. Setzte er das Gentianaviolett einer dicken Aufschwemmung der Bakterien zu, ließ sie dann bei Zimmertemperatur stehen und legte hernach Kulturen davon an, so ergab sich eine vollkommene Hemmung des Wachstums der positiven Bakterien, während man von den Gram-negativen, z. B. Bacterium coli und Pyocyaneus, üppige Kulturen erhielt. Prompter und schärfer fielen die Reaktionen aus, wenn Churchman die mit der Farbe versetzte Aufschwemmung 1 Std. auf 45° erwärmte.

Wesentlich differente Resultate erhielt Churchman bei der Verwendung von Säurefuchsin, wobei er sich stets der Erwärmung auf 45° bediente. Er fand, daß hier in der Aufschwemmung — innere Bakteriostase — die gramnegativen Bakterien abgetötet wurden, wogegen die positiven Sporenträger am Leben blieben. Setzt man aber Säurefuchsin zum Nährboden (Agar) zu, so erhält man nicht, wie man erwarten sollte, ein gleichsinniges Resultat, sondern das gerade Gegenteil. Die positiven Sporenträger erscheinen gehemmt, wogegen die negativen Bakterien wachsen. Aehnliche Resultate erhielt Churchman mit Acriflavin.

Noch während ich mit der Nachprüfung dieser Resultate beschäftigt war, erschien eine Arbeit von Burke und Skinner, welche nicht in der Lage waren, diese umgekehrte bakteriostatische Wirkung des Säurefuchsins zu bestätigen. Vielmehr zeigten sie, daß die größere Widerstandsfähigkeit der Sporenträger in der Säurefuchsinaufschwemmung nur ihrem Vermögen, Sporen zu bilden, zu danken sei. Wenn man Sporen ausschaltet, so widersteht z. B. Bacterium coli noch Säurefuchsinkonzentrationen, welche bereits die vegetativen Formen des Subtilis töten. So kamen die Verff. zu dem Schlusse, daß die von Churchman angenommene umgekehrte elektive Wirkung des Säurefuchsins lediglich eine Sporenwirkung sei. Die keimtötende Kraft des Säurefuchsins fanden sie sehr gering und nicht vergleichbar mit der des Gentianavioletts, bezüglich dessen sie Churchmans Befunde vollauf bestätigen.

Meine eigenen Versuche erstrecken sich außer auf Gentianaviolett und Säurefuchsin noch auf eine Reihe anderer Farbstoffe, die sowohl direkt im Nährboden, als auch in der Aufschwemmung angewandt wurden. Bei meinen Untersuchungen beschränkte ich mich nicht auf die grampositiven Sporenbildner, sondern zog auch andere grampositive Kokken und Bazillen heran.

Neutraler Agar wurde mit 1 Proz. einer gesättigten wäßrigen Gentianaviolettlösung versetzt und in Platten ausgegossen. Sodann wurden Aufschwemmungen angelegt von Agarkulturen von Staphylococcus citreus, Anthrax, Mesentericus vulgaris und Sac-

charomyces roseus einerseits, von Friedländer, Paratyphus B, coli und Pyocyaneus andererseits. Nach 24 Std. Bebrütung erhält man eine vollständige Hemmung der positiven und üppiges Wachstum der negativen. Verwendet man unter den gleichen Bedingungen einen Agar, der 2 Proz. der gesättigten Gentianaviolettlösung enthält, so erhält man bloß Wachstum von Paratyphus B; die drei andern negativen Keime sind nicht angegangen.

Tabelle I.

	Citreus	Anthrax	Mes.	Sacch. ros.	Friedl.	PTB.	Coli	Pyoc.
1 Proz.	—	—	—	—	+++	+++	+++	+++
2 „	—	—	—	—	—	+	—	—

Wenn man statt von einer Aufschwemmung direkt von Agar zu Agar abimpft, somit viel größere Mengen aufträgt, erzielt man auch auf 5proz. Gentianaviolettagar noch gutes Wachstum der negativen; nur der an sich schon schwach wachsende Cholerastamm konnte nie auf Gentianaviolettagar gezüchtet werden.

Betrachten wir nun die verschiedenen gramnegativen Stämme, die auf Gentianaviolettagar wachsen, genauer, so finden wir, daß auch diese keineswegs unbeeinflußt bleiben. Es zeigt sich, daß ein Teil lebhafte Fadenbildung aufweist, während andere unverändert sich als Kurzstäbchen präsentieren. Bei allen Versuchen, die ich anstellte, erwies sich der Pyocyaneus, auch durch 15 Generationen auf 5proz. Gentianaviolettagar fortgezüchtet, frei von jeder Fadenbildung. Besonders widerstandsfähig zeigte sich auch Bacillus lactis aërogenes, der nur ganz vorübergehend Fäden bildete und sich dann unbegrenzt als Kurzstäbchen weiterkultivieren ließ. Andere negative Bakterien zeigten sich recht empfindlich und bildeten auf Gentianaviolett sofort in der 1. Generation ein Fadengewirr, von dem in der 2. oder 3. Generation eine Ueberimpfung nicht mehr möglich war. Es ist nicht uninteressant, daß in derselben Art sich beträchtliche Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen zeigen. So hatte ich Coli-Stämme, die nie Fadenbildung zeigten und sich mühelos und unbegrenzt auf 5proz. Gentianaviolett weiterzüchten ließen, während andere gleich in der 1. Generation Gentianaviolettagar ausschließlich aus Fäden bestanden und in weiteren Generationen überhaupt nicht mehr fortkamen. In anderen Fällen zeigten die Stämme bei den ersten Umzüchtungen auf Gentianaviolett Fadenbildung, die später völlig verschwand. Offenbar hatten sich die Bakterien den veränderten Bedingungen angepaßt. Obwohl sich Typhus und Flexner relativ wenig widerstandsfähig erwiesen, zeigten sie trotzdem, auch noch in Degenerationsformen, unveränderte Agglutinabilität.

Impft man von den Platten mit Degenerationsformen auf gewöhnlichen Agar, so verschwindet sofort auch die stärkste Fadenbildung. Oft lassen sich bei Friedländer und X 19 helle Körnchen im Bakterienleibe nachweisen, die selbstverständlich keine Sporenfärbung geben.

Meine Resultate auf Säurefuchsinagar unterschieden sich wesentlich von denen Curchmans. Es wuchsen nämlich alle positiven und alle negativen, sogar ein sonst ziemlich empfindlicher Diphtheriestamm noch auf einem Agar, dem 5 Proz. einer gesättigten wäßrigen Säurefuchsinlösung (Grübler) zugesetzt waren. Die einzige Veränderung, die ich beobachten konnte, war die Entfärbung der Platte. Auch mikroskopisch habe ich positive und negative Bakterien, die ich auf 7 Gene-

rationen in 10proz. Säurefuchsinagar fortgezüchtet hatte, untersucht ohne je morphologische Veränderungen, wie Fäden oder Körnchenbildung zu finden.

Außer Gentianaviolett und Säurefuchsin untersuchte ich eine Reihe anderer Farbstoffe, vor allem Kristallviolett. Es zeigte sich, daß man schon bei Zusatz von 1 Proz. einer gesättigten wäßrigen Kristallviolettlösung eine deutliche Hemmung des Wachstums der Positiven erhält (Staphylococcus citreus, Sarcina flava, Saccharomyces roseus, Anthrax, Mesentericus vulgaris und Subtilis). Verwendet man 2- oder gar 5proz. Kristallviolettagar, so zeigen auch die negativen Bakterien vielfache Wachstumshemmung, vor allem auch, wie bei Gentianaviolett, reichliche Fadenbildung. Pyocyaneus läßt sich auf diesem Nährboden durch viele Generationen unverändert fortzüchten.

Ein weiterer Nährboden, der schöne elektive Resultate hinsichtlich der positiven und negativen Bakterien gab, war Malachitgrün. Verwendet man 1—2proz. Agar, so wachsen weder positive noch negative Keime. Erst auf 1/2proz. Malachitgrünagar erhalten wir gutes Wachstum des Bacillus pyocyaneus, während alle anderen Bakterien, negative wie positive, gehemmt sind. Nimmt man aber 0,1proz. Malachitgrünagar, so wachsen außer Pyocyaneus auch Paratyphus B und Friedländer, während Coli und die positiven noch nicht fortkommen. Auch bei Anwendung eines 0,05proz. Malachitgrünagars sind die Sporenträger (Anthrax, Subtilis und Mesentericus) noch vollständig gehemmt, während Staphylococcus citreus und Coli schon Wachstum zeigen.

2 weitere Farbstoffe, die zum Agar beigemengt, elektives Wachstum bewirken, sind Anilinviolett und Safranin. Gibt man von einer gesättigten wäßrigen Lösung eines dieser beiden Farbstoffe 1—2 Proz. zum Agar, so erzielt man vollkommene Hemmung der positiven bei gutem Wachstum der negativen.

Tabelle II. Anilinviolett:

Citreus	Anthrax	Mes.	Sacch. ros.	Friedl.	PTB.	Coli	Pyoc.
—	—	—	—	+++	++	+++	+++

Bei einer Reihe von Farbstoffen konnte mit derselben Technik keine elektive Wirkung erzielt werden. Hierher gehören: Bismarckbraun, Methylenblau, Phenyblau, Neutralrot und Karmin. Sie üben weder auf die positiven noch auf die negativen irgendeinen hemmenden Einfluß aus. Thionin hemmt in 5proz. Konzentration deutlich das Wachstum von Anthrax; die anderen Sporenträger kommen gleich den negativen Bakterien gut auf diesem Nährboden fort. 5 Proz. einer gesättigten wäßrigen Eosinlösung hemmen, dem Agar beigemischt, das Wachstum aller positiven Bakterien in der 2. Generation. Ich war emsig bestrebt, einen Farbstoff zu finden, der eine elektive Hemmung der negativen bewirkt. Nach einigen Versuchen wähnte ich, ihn im Hämatoxylin gefunden zu haben. Ich versuchte sowohl eine einfache alkoholische Lösung als auch den Böhmerschen Farbstoff. Beide hielten einer gründlichen Prüfung nicht Stich, sondern ergaben nur uncharakteristische Resultate. Im Zusammenhange damit prüfte ich auch den Alaun und fand, daß eine 1/2proz. Lösung, zum Agar zugesetzt, das Wachstum von Anthrax, Mesentericus und Subtilis vollkommen hemmt, wogegen merkwürdigerweise Staphylococcus citreus noch

sehr üppig wächst; aber auch die negativen sind stark gehemmt: so wachsen Friedländer, Typhus und Pyocyaneus überhaupt nicht, Coli allein zeigt spärliches Wachstum. Nimmt man 1proz. Alaunagar, so sterben alle Bakterien, mit Ausnahme von Staphylococcus citreus, der unentwegt gutes Wachstum zeigt. Alaun und Malachitgrün sind die einzigen Substanzen, die die positiven Bazillen früher hemmen als die Kokken; bei den anderen Farbstoffen ist es stets umgekehrt: die Kokken sind schon längst gehemmt, wo die Sporenträger noch üppiges Wachstum zeigen.

Mit Pikrinsäure und Lugolscher Lösung hatte ich ebenfalls keine Erfolge im Sinne einer elektiven Hemmung. Die intensive Braunfärbung des Pikrinsäurenährbodens durch Anthrax und Subtilis sei nur nebenbei erwähnt.

Ich ging nun daran, das Verhalten der einzelnen Bakterien in anderen, mit Farbzusätzen versehenen Nährböden zu studieren, und machte vor allem mit Bouillon Versuche. Zuerst ein Parallelversuch mit 1proz. Gentianaviolett und Säurefuchsinbouillon, immer die wäßrige gesättigte Farblösung als Grundlage genommen:

Tabelle III.

	Anthrax	Citreus	Flexner	X 19	Pyoc., alle nach 48 Bebrütung
Gentianaviol.	—	—	+	+	—
Säurefuchs.	+++	+++	+++	+++	+++

Aus dieser Tabelle geht der schon früher beobachtete große Unterschied in der Desinfektionskraft der beiden Farben wieder klar hervor; ferner konstatieren wir eine völlige Hemmung der positiven neben schwachem Wachstum der negativen in Gentianaviolett. Weitere Versuche zeigten, daß die Sporenträger auch in einer 2proz. Lösung noch nicht alle abgetötet werden. Es gelang mir, aus 2proz. Gentianaviolettbouillon selbst nach 11 Tagen noch Subtilis und Mesentericus zu isolieren, ebenso hielt die rote Hefe stand, wogegen Kokken und Diphtheriebazillen stets sofort abgetötet wurden. Nimmt man dagegen 5proz. Gentianaviolettbouillon, so werden alle grampositiven Keime ohne Unterschied vollkommen in ihrem Wachstum gehemmt, während die negativen noch immer gutes Wachstum zeigen. In 5proz. Säurefuchsinbouillon gleich üppiges Wachstum der negativen und der positiven. Ich prüfte auch 3 Anaëroben, nämlich malignes Oedem, Anthrax symptomaticus und Putrificus Bienstock in Tarozzi-Bouillon, der ich 5 Proz. einer gesättigten wäßrigen Gentianaviolettlösung zugesetzt hatte. Von der 1. Generation gelangen reichliche Kulturen, doch setzte in der 2. das Wachstum völlig aus.

Setzt man zu 5 ccm Bouillon einen Dritteltropfen einer gesättigten wäßrigen Kristallviolettlösung, erwärmt dann die beimpften Röhrchen 1 Std. auf 45°, so erzielt man eine vollkommene Wachstumshemmung von Citreus, Anthrax, Mesentericus und Subtilis, während Lactis aërogenes, Typhus, Coli und Friedländer gutes Wachstum zeigen. Ein ganz analoges Resultat erhält man durch Zusatz eines Fünfteltropfens gesättigter wäßriger Malachitgrünlösung.

Versuche mit Gelatineplatten, denen 1—2 Proz. einer gesättigten wäßrigen Gentianaviolettlösung zugesetzt waren, ergaben ein ganz analoges Resultat wie der Agar, nämlich eine ausgesprochene elektive Hemmung der positiven bei gutem Wachstum der negativen.

Ich wollte nun sehen, ob etwa der Aggregatzustand etwas ändere, und hielt die Gelatine im Brutofen, bis sie sich verflüssigte, beimpfte

sie mit den entsprechenden Keimen und konnte dann erst nach Zusatz von 5 Proz. Gentianaviolett die ausgesprochene Hemmung aller Positiven feststellen. Demnach verhielt sich die feste Gelatine wie Agar, die flüssige wie Bouillon.

Es handelte sich nun darum, die innere Bakteriostase, oder, wie sie Churchman in der früheren Arbeit nennt die Bakterizidie festzustellen, indem man das Verhalten in einer mit Farbstofflösung versetzten Kochsalzaufschwemmung untersuchte. Ich hielt mich zuerst genau an Churchmans Versuchsanordnung, und zwar nahm ich von Säurefuchsin und Gentianaviolett gleiche Mengen. Churchman gibt keine Gentianaviolettdosis an, wohl aber für Säurefuchsin 5 Tropfen einer gesättigten wäßrigen Lösung auf 20 Tropfen einer dichten Bakterienaufschwemmung. Als Kontrollen zog ich neben physiol. Kochsalzlösung noch Methylenblau heran, das, wie erinnerlich, in Agar keinerlei hemmende Wirkung ausübt. Es ergab sich folgendes Resultat:

Tabelle IV.

	Citreus	Subtilis	Coli	Pyocyaneus
Gentianaviolett	—	—	—	—
Methylenblau	—	—	—	—
Säurefuchsin	(+)	+++	+++	+++
Kochsalz	+++	+++	+++	+++

Wie man sieht, ist die Konzentration viel zu stark, um eine elektive Wirkung des Gentianavioletts zur Geltung kommen zu lassen, auch das auf Agar so wenig wirksame Methylenblau hemmt alle Keime. Wie gering muß die Desinfektionskraft des Säurefuchsins sein, wenn es auch dann noch nicht in der Lage ist, das Wachstum der Keime zu hemmen! Von einer elektiven Hemmung der negativen ist keine Rede. Im Gegenteil zeigen die positiven Kokken gegenüber den anderen Bakterien relativ schwaches Wachstum.

Um klar zu sehen, mußte ich die Versuche auf breiterer Basis mit verschiedenen Konzentrationen wiederholen. Beginnen wir mit Gentianaviolett. Ich gab einen Tropfen der gesättigten wäßrigen Lösung auf 2 ccm einer dichten Bakterienaufschwemmung, erwärmte 1 Std. auf 45 ⁰ und legte dann Kulturen auf der gewöhnlichen Agarplatte an. Staphylococcus citreus und roseus, Anthrax, Subtilis, Mesentericus vulgaris und Helvolus waren im Wachstum vollkommen gehemmt; freilich schädigte die Lösung in dieser Konzentration auch die negativen Bakterien derart, daß Typhus, Proteus und Friedländer überhaupt nicht wuchsen, widerstandsfähige Keime, wie Coli, Lactis aërogenes und Pyocyaneus nur schwaches Wachstum darboten. Nimmt man dagegen nur $^1/_2$ Tropfen der Farblösung, so tauchen bereits wieder Mesentericus-Kolonien auf. Es ergab sich schließlich als Schwellenwert der elektiven Hemmung $^2/_3$ Tropfen der gesättigten wäßrigen Lösung, eine Konzentration, bei der kein positiver Keim wuchs, hingegen Paratyphus B, Coli, X 19 und Friedländer befriedigendes Wachstum zeigten. Die Schwellenbreite der elektiven Wirkung ist somit bei Gentianaviolett recht gering.

Viel leichter geht der Versuch, wenn man statt Gentianaviolett Kristallviolett verwendet. Durch Zusatz eines Dritteltropfens der frisch bereiteten gesättigten wäßrigen Lösung von Kristallviolett läßt sich sehr schön die vollkommene Hemmung der positiven, das gute Wachstum der negativen demonstrieren.

Tabelle V.

Citreus	Anthrax	Mes.	Saccharom.	Lactis aërog.	Ty.	Coli	Pyoc.
—	—	–	—	++	++	++	++

Verwendet man die Lösung nach einigen Tagen, so erhält man gleich wieder Wachstum der Sporenträger bei derselben Konzentration.

Streng spezifische Hemmung erhält man auch, wenn man $^1/_{10}$ Tropfen Malachitgrün zu 2 ccm Aufschwemmung fügt und sodann 1 Std. auf 45° erwärmt. Erwärmt man nur kürzere Zeit, so sind die Sporenträger nicht abgetötet, selbst wenn man $^1/_5$ Tropfen verwendet. Ueberhaupt konnte ich bei allen meinen Versuchen mit Aufschwemmung die Behauptung Churchmans nicht bestätigen, daß es einerlei sei, ob man die mit Farblösungen versetzten Kulturen längere Zeit bei Zimmertemperatur stehen läßt oder 1 Std. auf 45° erwärmt. Für meine Versuche erwies sich die Erwärmung als unerläßlich.

Die Schwellenbreite ist hier größer als beim Gentianaviolett. Man erhält sowohl mit $^1/_{10}$ wie mit $^1/_{20}$ Tropfen deutliche elektive Hemmung der positiven. Als Beispiel möge Tab. VI dienen:

Tabelle VI. Malachitgrün $^1/_{10}$ Tropfen.

Citreus	Anthrax	Mesent.	Rote Hefe	Friedl.	Paraty B	Coli	Pyoc.
—	—	—	–	+	++	++	+

Anilinviolett und Safranin, die uns auf der Agarplatte deutlich das Bild der elektiven Hemmung gegeben hatten, zeigen dagegen in der Aufschwemmung nicht die Fähigkeit, die Sporenträger zu hemmen, wohl aber die positiven Kokken. Greift man aber zu höheren Konzentrationen, so werden die negativen Bakterien mitgehemmt.

Eine elektive Hemmung der negativen durch Säurefuchsin ließ sich unter keinen Umständen nachweisen. Selbst 10 Tropfen einer gesättigten wäßrigen Säurefuchsinlösung auf 2 ccm, somit eine Konzentration der Farblösung von 25 Proz., genügen nicht, das Wachstum der negativen zu hemmen, trotz 1stünd. Erwärmens auf 45°. Ja es zeigt sich sogar, wie aus Tab. V hervorgeht, daß die grampositiven Kokken nur noch sehr schwach wachsen, während die grampositiven Sporenträger gut vorwärts kommen, jedoch keineswegs üppiger sind als die gramnegativen Bakterien.

Tabelle VII. Säurefuchsin.

Citreus	Anthrax	Mesent.	Subtilis	Lactis aërog.	Typhus	Coli	Pyoc.
(+)	+++	++	++	+++	+++	+++	+++

Interessant ist, daß, wenn man statt Säurefuchsin 10 Tropfen einer gesättigten wäßrigen Lösung von basischem Fuchsin nimmt, man zwar schwaches Wachstum der Kokken und positiven Sporenträger, aber noch immer gutes der negativen Bakterien erhält.

Schlußfolgerungen.

A. Gentianaviolett, Kristallviolett, Malachitgrün, Anilinviolett und Safranin geben, dem Nährboden (Agar, Bouillon oder Gelatine) in entsprechenden Konzentrationen beigemischt, eine elektive Hemmung des Wachstums der grampositiven Bakterien. In flüssigen Nährböden scheint die Wirksamkeit der Farbstoffe herabgesetzt, weil die doppelten Konzentrationen zur Hemmung erforderlich sind. — B. Fügt man die

Farblösungen einer Kochsalzaufschwemmung hinzu, so erhält man, nachträglich auf neutralem Agar kultivierend, elektive Hemmung des Wachstums aller positiven Keime nach Zusatz von Gentianaviolett, Kristallviolett und Malachitgrün, jedoch nur nach 1stünd. Erwärmung der Mischung auf 45°. Durch Zusatz von Anilinviolett oder Safranin werden die Sporenträger nicht abgetötet. — C. Eine elektive Hemmung des Wachstums der negativen Bakterien konnte weder mit Säurefuchsin noch mit irgendeinem anderen Farbstoff erzielt werden, einerlei ob man den Farbstoff der Bakterienaufschwemmung oder dem Nährboden zusetzte. — D. Von den untersuchten Farbstoffen kommt dem Malachitgrün die größte, dem Säurefuchsin die geringste Sterilisationskraft zu. — E. Auch die negativen Bakterien zeigen vielfach eine ausgesprochene Empfindlichkeit gegen die Farbstoffe, welche das Wachstum der positiven hemmen. Die meisten wachsen zwar, doch mit deutlichen Degenerationserscheinungen, wie Fäden- und Körnchenbildung. Dabei sind die einzelnen Arten verschieden empfindlich. Am widerstandsfähigsten erwiesen sich Lactis aërogenes und vor allem Pyocyaneus. Auch innerhalb einer einzelnen Art, wie Bacterium coli, zeigen sich diesbezüglich weitgehende Unterschiede.

Literaturverzeichnis.

Kraus u. Uhlenhuth, Handb. d. mikrobiol. Techn. Bd. I. Eisenberg, Ph., Theorie der Bakterienfärbung. — Churchman, The reverse selective action of acid Fuchsin. (Journ. of Exper. Med. Vol. 37. Nr. 1.) — Churchman, The mechanism of Bacteriostasis. (Ibid. Vol. 37. Nr. 4.) — Churchman, Bacteriostasis by mixture of dyes. (Ibid. Vol. 38. Nr. 1.) — Burke and Skinner, The reverse selective bacteriostatic action of acid Fuchsin. (Ibid. Vol. 39. Nr. 4.)

Inhalt.

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena — 5297

Centralbl. f. Bakt. etc. I. Abt. Originale. Bd. 94. Heft 6.

Ausgegeben am 8. April 1925.

Untersuchungen über einen Erreger der ägyptischen Augenentzündung (Koch-Weeksches Bacterium) und seine Beziehungen zum Pfeifferschen Influenzabazillus.

IV. Mitteilung: Histidinhydrochloridnährmittel zur Züchtung hämophiler Keime.

[Aus der Staatlichen Bakteriologischen Untersuchungsanstalt Erlangen (Geh. Med.-Rat Prof. Dr. L. Heim, Prof. Dr. W. Weichardt).]

Von Priv.-Doz. Dr. med. **Maximilian Knorr,** Oberarzt der Anstalt, und Dr. med. **Walter Gehlen.**

Die „hämophilen" Keime gehören zu den Arten, die außerhalb des Körpers ihre Nährmittelansprüche auch im Laufe vieler Generationen nicht wesentlich verändern [1]). Eigenarten mancher Stämme sind sowohl von anderen (insbesonders Fildes) wie auch von uns beobachtet worden. Sie treten als Unterschiede in der Stärke des Wachstums, manchmal auch durch Rückschläge zu einfacheren Ernährungsbedingungen in die Erscheinung. Züchtet man solche Außenseiter, wie sie Fildes nennt, nicht in mehreren Generationen weiter, dann kommt man leicht zu falschen Schlüssen; die einfacheren Ernährungsbedingungen genügen nämlich immer weniger, das Wachstum nimmt ab und bleibt schließlich aus. Stämme, die so aus der Art zu schlagen scheinen, sind nicht häufig und werden bei sorgfältiger Beobachtung leicht entdeckt.

Diese Erscheinung ist wohl darauf zurückzuführen, daß die „Hämophilen" genau so wie andere Arten Reservestoffe aufspeichern und Nährmittelbestandteile an ihre Leiber adsorbieren. Es liegt am nächsten, daß so auch die in den vorhergegangenen Mitteilungen besprochenen V- und X-Stoffe einige Generationen hindurch von den Zellen festgehalten werden. Stämme, die besonders dazu neigen, wird man wohl als die Außenseiter annehmen müssen. Wir verstehen so, daß schon die Aufschwemmung in Kochsalzlösung in der Hauptsache vor Ueberraschungen schützt, da durch das Waschen die Keime von den Nährmittelbestandteilen befreit werden. Nur die Keime oder besser Stämme, die die wachstumfördernden Stoffe in festerer Bindung haben, können noch einige Generationen damit auskommen.

Ueber die Bedeutung der V- und X-Stoffe bei den „Hämophilen" hat Knorr in der III. Mitteilung berichtet. Er fand auf dem Wege

1) „Hämophil" sind Bakterien, die auf den gebräuchlichen Nährmitteln nur dann gedeihen, wenn in ihnen Blut in irgendeiner Form enthalten ist. Bisher hat man darunter auch solche Keime gerechnet, die in den ersten Zuchten vom Körper weg diesen Anspruch erwiesen, später aber doch auf blutfreien Nährmitteln wuchsen. Nach unseren neuerlichen Erfahrungen können wir unter hämophilen Keimen nur diejenigen verstehen, die in allen Fortzuchten Blutbestandteile unbedingt beanspruchen, allerdings mit der Einschränkung, daß die zum Wachstum erforderlichen Blutbestandteile durch V- oder X-Stoffe oder beide zusammen ersetzt werden können.

der Ausschaltung des V-Körpers durch gewisse Sera und der Adsorption des X-Körpers an Knochenkohle das Gleiche, wie früher Fildes mit Hämatin (X) und Hefeauszug (V): Die Influenzabazillen und die ihnen entsprechenden Koch-Weeksschen Keime benötigen V und X, die hämolytischen Influenzabazillen nur V und der Bac. haemoglobinophilus canis nur X.

Der Annahme, daß der V-Stoff vitaminartiger Natur sei (Davis, Thjötta und Avery) steht bisher nichts im Wege; auch die Bedeutung des X-Körpers als katalytisches Agens (Thjötta und Avery) oder als Peroxydase (Fildes) wäre nicht widerlegt, wenn man von der Arbeit Jacobys und Frankenthals absieht. Jacoby und Frankenthal (1921) behaupten nämlich, die vielfach von anderen und uns gekennzeichneten V- und X-Stoffe durch Aminosäuren des Hämoglobin, Histidin oder Leucin ersetzen zu können.

Würden sich die Befunde dieser Autoren bestätigen, dann bestünde ihre Ansicht zu Recht, „daß diese Feststellungen von Interesse wären, welches weit über das begrenzte Gebiet des Bakterienwachstums hinausgehe". Die Forscher sehen den Fortschritt auf dem Vitamingebiet in Befunden, welche in eine Reihe mit der grundlegenden Entdeckung von Hopkins über die Bedeutung des Tryptophans für die tierische Ernährung gestellt werden können. Wir haben diese Histidinversuche eingehend nachgeprüft und erweitert, indem wir nicht nur mit Influenza- bzw. Koch-Weeks-Stämmen gearbeitet haben, sondern auch die hämolytischen Influenzabazillen und den Bac. haemoglobinophilus canis in die Untersuchungen einbezogen und die allenfallsige Bedeutung der Aminosäure als V- oder X-Stoff untersuchten.

Versuchstechnik.

Die Angaben der Autoren lauten: „Wir verzichteten darauf, es (Histidin nämlich) selbst aus dem Hämoglobin zu isolieren, da uns ein reines käufliches Präparat zur Verfügung stand. Wir verwendeten Histidinhydrochlorid in 1proz. wässeriger Lösung in der Menge von 1—2 ccm auf 10 Agar. Das Histidin-Agargemisch wurde kurz aufgekocht und die Röhrchen dann schräg erstarrt. Auf diesem Nährboden konnte in zahlreichen Versuchen ein deutliches Wachstum von Influenzabazillen erzielt werden, und zwar wurden die Kulturen durch 3 Generationen fortgezüchtet. Dann wurden die Versuche abgebrochen. Bei jeder Ueberimpfung von Histidinagar auf Histidinagar wurde gleichzeitig auf Lewinthal-Nährboden und auf gewöhnlichen Agar überimpft. Jedesmal ergab sich Wachstum auf Lewinthal-Nährboden, und zwar erheblich üppiger als auf Histidin, während das Agarröhrchen vollkommen steril blieb. Das mikroskopische Bild zeigte das typische Bild des Influenzabazillus." Zu ihren Versuchen benützten J. und F. einen Influenzastamm von Levinthal.

Wir benützten Histidinhydrochlorid der Firma Schuchardt in Görlitz, das nach den Angaben von Knoop und Windaus hergestellt war.

Die Abstammung des Präparates veranlaßte zunächst die Prüfung auf Peroxydasen unter den früher (Arch. f. Hyg. Bd. 92. S. 136) niedergelegten Gesichtspunkten. Eine 1proz. Histidinhydrochloridlösung gab die Benzidinreaktion schwach, aber sofort, eine 0,2proz. schwächer und später, aber noch deutlich, eine 0,16proz. eben noch, wenn man größere Mengen im Reagenzglas im durchfallenden Licht prüfte.

Entsprechend den Angaben von Olsen, daß das Influenzawachstum der Benzidinprobe parallel gehe, erfüllte also das Präparat die eine Bedingung, die Anwesenheit des X-Faktors. Aber schon Olsen zeigte, daß nur ein Blutabkömmling, der gleichzeitig den Globinanteil enthalte, wirksam sei. Dieser Globinanteil, der die Biuretreaktion gibt, ist nach

unserer Ansicht dem V-Körper gleichzustellen. Das Histidinhydrochlorid gab die Biuretreaktion nicht.

Die Histidinhydrochloridlösung reagierte sauer. Gerade die Influenzabazillen verlangen nun sorgfältige Einstellung des Nährmittels auf PH 7,2—7,6. Wir bereiteten den Nähragar so, daß unser Histidinhydrochloridagar die Reaktion in diesen Grenzen hatte. In der gleichen Weise verfuhren wir bei der Prüfung in Nährflüssigkeiten (Standard-Nährbrühe nach Kuczynski und Ferner von Merck eignet sich zu solchen Versuchen besonders). Die Benützung eines flüssigen Nährmittels bei derartigen Versuchen haben Braun und Cahn-Bronner mit Recht empfohlen.

Die Influenzabazillen müssen aber auch auf einem Nährboden mit nicht zu hochprozentigem Agargehalt gezüchtet werden, eine schon von Weeks gemachte Feststellung, auf die später wieder Olsen aufmerksam machte. Der Agargehalt in unseren Versuchen betrug stets 1,2—1,5 Proz.

Die Beimpfung geschah mit 24-, höchstens 48stünd. Levinthal-Kulturen, die aus den eingangs erwähnten Gründen in Kochsalzlösung, wenn nicht anders bemerkt, aufgeschwemmt wurden.

Zur Vermeidung von einseitigen Ergebnissen benützten wir von Anfang an mehrere Stämme.

Die Angabe von Jacoby und Frankenthal „kurz Aufkochen" variierten wir verschiedentlich, da das Kochen bei Influenzanährmitteln von wesentlicher Bedeutung sein kann. Die Histidinlösungen wurden, wo nicht anders angegeben, zum kochend heißen Agar zugesetzt.

Der Nähragar und die Nährbrühe wurden vor Mischung mit der Histidinlösung 30 Min. im Autoklaven bei 120° erhitzt, um die allenfalls vorhandenen V- und X-Körper auszuschalten. Nähragar, der nur $^1/_2$ Std. gedämpft wird, enthielt meist erhebliche Mengen von X und bisweilen Spuren von V (wässeriger Fleischauszug!)

Die Benützung von schräg erstarrtem Agar scheint nicht ohne Gefahr. Ist der Agar trübe, dann bemerkt man eine im Agar liegende Amme, die das Wachstum der Keime ermöglicht, häufig nicht. Sogar bei klarem Agar ist es oft nicht leicht, eine winzige Ammenkolonie im Reagenzglas zu entdecken. Anders bei Platten, die wir von beiden Seiten mit dem Mikroskop durchmustern können. Wir bemerken dies deshalb, weil selten das kurze Aufkochen des Histidinagargemisches zur völligen Sterilisierung genügte und die dann oft kaum sichtbar gewachsenen Ammen zu falschen Schlüssen hätten verführen können.

1. Versuch. Eine 1proz. Histidinhydrochloridlösung wird 20 Min. gedämpft. Davon 10,0 auf 100 Agar. Etwa 2 Min. aufkochen, dann Platten gießen.

Aussaat[1]: a) I.B., WL, K.W.B. 1048, 4810, Astrup aus Kochsalzaufschwemmung.

b) I.B. 14, K.W.B. 1048 aus Kulturen in Thyrodelösung mit frischen, sterilen Kartoffelstückchen. Je 2 Stämme.

Ergebnis: Nach 48stünd. Bebrütung auch nicht mikroskopisch sichtbares Wachstum feststellbar.

c) Direkte Aussaat einer 1 mm-Oese von 48stünd. Levinthalagarkulturen. Kulturmasse deutlich auf der Platte sichtbar.

Ergebnis: Nach 48stünd. Bebrütung nur Astrup (5 Kolonien) gewachsen. In Ausstrichen werden starke Involutionsformen festgestellt.

---

1) I.B. = Influenza, K.W.B. = Koch-Weeks-Bazillen, Astrup = hämolytischer Influenzabazillenstamm Astrup, B. canis = Bac. haemoglobinophilus canis. Die beiden letzteren Stämme stellte Herr Dr. Kristensen in liebenswürdiger Weise zur Verfügung.

d) Da anzunehmen ist, daß sich die Keime ohne Koloniebildung bei der starken Aussaat auf dem Agar halten, wird nach 48stünd. Bebrütung von allen Aussaaten abgeimpft.

Ergebnis: K.W.B. 1048 nach 48stünd. Bebrütung gewachsen, die übrigen Stämme nicht.

e) Dicke Aussaaten wie in c), aber mit Ammen (gelbe Luftkokken).

Ergebnis: Nur Astrup üppig gewachsen.

f) Wiederholung des Versuches e) mit Kochsalzaufschwemmungen.

Ergebnis: Nur Astrup mit und ohne Amme, jedoch bedeutend schwächer wie in e) gewachsen; II. Generation ohne Ammen ausgeblieben.

2. Versuch. Zu Nähragar werden gegeben 0,25, 0,5, 1,0 Proz. Histidinhydrochlorid. Etwa 2 Min. aufkochen, Platten gießen.

Aussaat: I.B. WL, 14; K.W.B. 1048; Astrup; B. canis aus Kochsalzaufschwemmungen.

a) Mit Ammen, b) ohne Ammen.

Ergebnis: In a) nur Astrup üppig gewachsen. Alle anderen Stämme nicht. In b) kein Stamm gewachsen.

3. Versuch. Zu Nähragar werden gegeben 0,04, 0,08, 0,12, 0,16, 0,2 Proz. Histidinhydrochlorid. Aufkochen 1 Min.

Aussaat: Stämme wie in Versuch 2 a) mit Ammen (gelbe Luftkokken) b) ohne Ammen aus Kochsalzaufschwemmung. c) Ohne Ammen aus Kondenswasser von Levinthal-Schrägagarkulturen.

a) 0,04 I.B. WL. ±, 14 +, K.W.B. 1048 —, Astrup ++++, B. c. —
0,08 „ „ ±, „ ±, „ „ +, „ ++++, „ „ —
0,12 „ „ —, „ —, „ „ ±, „ ++++, „ „ —
0,16 „ „ ±, „ ±, „ „ ±, „ ++++, „ „ —
0,20 „ „ +, „ ±, „ „ ++, „ ++++, „ „ —
Ohne H. —, „ ±, „ „ —, „ ++++, „ „ —.

b) und c) kein Wachstum.

4. Versuch. Herstellung einer 5proz. Lösung von Histidinhydrochlorid. Ein Teil wird alkalisiert mit 2,0 ccm Sodalösung auf 20,0, der andere Teil entsprechend mit 2,0 destilliertem Wasser versetzt, so daß alkalische und saure Lösung etwa 4,5proz. sind. Beide Lösungen sind benzidinpositiv. Filtration durch Kieselgur auf Ganzglasfilter nach Knorr[1]). Es wird nun

a) Nähragar, b) nur X-haltiger Nähragar, c) nur V-haltiger Zitronensaftnähragar[2]) teils mit der sauren, teils mit der alkalischen Lösung versetzt, so daß jede Probe 0,1proz. Histidinhydrochlorid enthielt.

Aussaat: Da in diesem Versuch festgestellt werden sollte, ob das Histidin fähig ist, einen der beiden Faktoren, die zum Wachstum der Influenzabazillen (Koch-Weeks-Bazillen) nötig sind, zu ersetzen, geschah die Beimpfung nur mit je 2 Kulturen von I.B. 14 und K.W.B. 1048 (Kartoffelthyrodestämme in 87. Generation).

Ergebnis: Auch nicht Spur von Wachstum.

5. Versuch.

a) Standardbrühe I Merck als Kontrolle.

b) Standardbrühe I Merck + 0,1 Proz. Histidinhydrochlorid.

c) Standardbrühe I Merck + 0,1 Proz. Histidinhydrochlorid 10 Minuten in das kochende Wasserbad gestellt.

d) Standardbrühe I Merck + 0,1 Proz. Histidinhydrochlorid, keimfrei filtriert wie im Versuch 4.

Alle Röhrchen werden beeimpft mit einer Nadelspitze Kulturmasse 24stünd. Levinthal-Kulturen von I.B., WL, K.W.B., 1048, Astrup, B. canis.

Bei der angewendeten Erhitzung blieben nicht alle Proben von Verunreinigungen frei. Zur Bewertung waren übrig bei:

a) sämtliche Stämme, b) nur Astrup, c) K.W.B. 1048, Astrup, B. canis, d) alle Stämme.

1) Zu derartigen Versuchen ist nur ein Filter geeignet, das keine metallischen Teile hat und auch mit eingreifenden Mitteln zu reinigen ist. Das Glasfilter besteht aus Jenaer Glas in einem Stück. Es kann den jeweiligen Anforderungen entsprechend in einfacher Weise mit selbst zu bereitenden Kieselgurschichten beschickt werden. Eine ausführliche Veröffentlichung über das Filter folgt in Bälde. Das Filter ist erhältlich bei Höpfner, Glaswaren, Nürnberg, Bönerstraße 6.

2) Nähragar + Zitronensaft 1:200. Entfernt man V im Levinthal-Agar durch Erhitzen im Autoklaven (Indikator: Nur Wachstum von B. canis) und gibt auf 200 Teile des Agars dann 1 Teil Zitronensaft, dann gedeihen auf dem Nährmittel wieder I.B. (K.W.B.), da im Zitronensaft V-Körper enthalten sind.

Ergebnis: a) kein Stamm gewachsen, b) Astrup nicht gewachsen, c) K.W. 1048 und B. canis gewachsen, d) kein Stamm gewachsen.

Alle Kulturen wurden bei der Aussaat auf Levinthal-Agar zur Wachstumskontrolle auch in 2. Generation überimpft. Hier blieben alle Stämme aus.

6. Versuch. Wiederholung des Versuches 5, jedoch nur in a), c) und d) mit allen Stämmen. Aus der ersten Generation gelang es nur K.W.B. 1048 in a) zurückzuzüchten, aus der 2. Generation ging kein Stamm mehr an.

7. Versuch. War veranlaßt durch die Feststellung von Herrn Prof. Dr. Johannes Müller, dem über die positive Benzidinprobe des Präparates berichtet worden war, daß unser Histidinhydrochlorid einen Schmelzpunkt von 231 habe, also verunreinigt sei. Nach Reinigung des Präparates, wofür wir Herrn Prof. Dr. Müller auch hier unseren Dank aussprechen, hatte das Präparat den Schmelzpunkt 251. Eine 1proz. Lösung gab eine sehr schwache Benzidinprobe, diese erst nach längerer Zeit und entsprach also etwa einer 0,16-proz. Lösung des ungereinigten Histidinhydrochlorids.

Wir haben zu Nähragar a) 0,25 und 0,4 Proz. ungereinigtes Histidinhydrochlorid, b) dieselben Mengen des reinen Präparates gegeben.

a) ohne Ammen: I.B. 14 —, K.W.B. 1048 —, Astrup —, B. canis —,
mit Ammen: 0,25 Proz. Hist. ±, „ 1048 ±, „ +++, „ —,
0,4 Proz. Hist. Platte verunreinigt.

b) ohne Ammen: kein Stamm gewachsen.
mit Ammen: 0,4 wie Versuch a) mit 0,25 Proz. Histidinhydrochlorid.

Außer den angeführten haben wir noch eine Reihe anderer Versuche mit dem gleichen Ergebnis zu verzeichnen.

In sämtlichen Versuchen waren die gleichen Mengen auch auf gewöhnlichem Levinthalagar zur Kontrolle ausgesät worden. Mit Ausnahme von Bac. haemoglobinophilus canis, der auf einem Kochblutagar oft schwächer wächst, gingen die Kontrollaussaaten stets üppig an.

Besprechung der Versuchsergebnisse.

Es gelang nie, auf 1,2—1,5proz. Nähragar, der zwischen PH 7,2 bis 7,6 eingestellt war, nach Zusatz von Histidinhydrochlorid bis zu 1,0 Proz. Influenzabazillen (Koch-Weekssche Baz.), hämolytische Influenzabazillen Stamm Astrup und Bac. haemoglobinophilus canis zum Wachstum zu bringen, wenn die zu derartigen Versuchen unbedingt erforderlichen Kochsalzaufschwemmungen zur Aussaat benützt worden waren. Die gelungene Züchtung des Stammes Astrup im Versuch 1f in nur einer Generation zeigt, daß manchmal durch Zufälle bei der Aussaat (Verstreichung eines Kulturrasenklümpchens) das Vorhandensein der V- oder X-Stoffe vorgetäuscht sein kann.

Da sich der Stamm Astrup in der Tat schwer in Flüssigkeit verreiben läßt, erklärt sich das Ergebnis noch einfacher. Aehnliche Verhältnisse finden wir im Versuch 5, wo je eine Nadelspitze voll Kulturmasse in Nährflüssigkeiten eingetragen wurde. Es hatte bei dem Ausbleiben der Kontrollen fast den Anschein, als ob der Histidinzusatz das Wachstum wenigstens befördere. Aber auch hier gingen die Kulturen über die erste Generation nicht hinaus und bei Wiederholung des Versuchs wuchs der K.W.B.-Stamm 1048 ebenfalls in einer Generation in der Kontrolle.

Da das Histidinhydrochlorid auch in gereinigtem Zustand noch die Benzidinprobe gibt, nimmt es nicht wunder, daß man in den Ammenversuchen, besonders in Versuch 3 die Wirkung des X-Körpers zu erkennen glaubt. Allerdings schlugen die Ergänzungsversuche mit V-haltigem Zitronensaft fehl und auch auf gewöhnlichem Agar war eine Spur Ammenwachstum bei einem Influenzastamm festzustellen. Man kann somit nicht behaupten, daß durch Histidin der X-Körper vertreten werden könne, zumal man sicher bei einem entsprechend den Anforderungen der Vitaminlehre ganz reinen Histidin

die Benzidinprobe vermissen wird. Der nur auf X angewiesene Bac. haemoglobinophilus canis kam entsprechend in keinem Versuch zum Wachstum oder höchstens nur in einer Generation, weil der X-Körper im verwendeten Histidinchlorid in zu geringer Menge vorhanden war. Da die hämolytischen Influenzabazillen nur V brauchen, überrascht das gute Wachstum auch auf dem Kontrollagar mit Ammen nicht, sondern bestätigt nur die bisherigen Ergebnisse.

Zusammenfassung.

Die Angaben von Jacoby und Frankenthal, daß Zusatz von 0,1—0,2 Proz. Histidinhydrochlorid zu Agar ein dauerndes Wachstum der Influenzabazillen gestatte, konnte mit einem von Schuchardt-Görlitz bezogenen Präparat (S=231) auch nach dessen Reinigung (S=251) mit Influenzabazillen (Koch-Weeks Bac.) nicht bestätigt werden. Die Möglichkeiten, die zu dem Ergebnis von Jacoby und Frankenthal geführt haben können, werden eingehend besprochen.

Die Prüfung des Präparates auf die wachstumfördernden Stoffe für die „hämophile" Gruppe biuretpositives V (= Stoff mit Vitaminnatur?) und benzidinpositives X (= katalytisches Agens? Peroxydase?) ergab nur die Anwesenheit des X-Stoffes. Dieser Körper verschwindet aber entsprechend der Reinigung des Präparates mehr und mehr. Der selbst im ungereinigten Präparat in größerer Menge enthaltene benzidinpositive Körper genügte nicht, um das Wachstum des nur auf X angewiesenen Bac. haemoglobinophilus canis zu ermöglichen, selbst wenn bis zu 1 Proz. des Präparates zum Nährmittel gegeben wurde. Eine gewisse Wirkung des X-Körpers in Ammenversuchen war nicht völlig auszuschließen und entspricht unseren Anschauungen über das Zustandekommen des Ammenwachstums.

Dem Hilfsausschuß der Rockefeller-Stiftung danken wir für die Unterstützung zur Ausführung dieser Arbeit.

Bericht über Malariaarbeiten in Dalmatien[1]).

(Aus dem Malaria-Institut in Trogir und dem Institut für Schiffs- und Tropenkrankheiten zu Hamburg.)

Von Prof. Dr. **P. Mühlens**, Hamburg, Tropeninstitut, und Dr. **A. Sfarčić**, Trogir, Malaria-Institut.

Mit 3 Doppeltafeln.

Inhaltsübersicht.

1) Erstattet an das jugoslavische Gesundheits-Ministerium (Ministarstvo Narodnog Zdravlja). Publ. in jugoslavischer Sprache. Zagreb 1924.

Einleitung.

Die im vorliegenden Bericht niedergelegten Beobachtungen stellen die Ergebnisse von gemeinsamen Arbeiten in Dalmatien dar, zu denen der eine von uns (Mühlens) in der Zeit vom 13. 9. bis 3. 11. 1922, sowie vom 2.—17. 5. 1923, und vom 21. 6. bis 21. 7. 1923 von der Hygiene-Sektion des jugoslavischen Gesundheitsministeriums eingeladen worden war. Die Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit dem von Dr. Sfarčić geleiteten Malariainstitut in Trogir ausgeführt. In einem vorläufigen Bericht hatten wir bereits am 5. 11. 1922 unsere Herbstbeobachtungen dem Gesundheitsministerium in Belgrad berichtet, von einer Veröffentlichung in der medizinischen Presse jedoch Abstand genommen, da uns vorher noch eine Ergänzung durch Frühjahrsbeobachtungen notwendig schien. Leider mußten diese in der Zeit vom 17. 5. bis 21. 6. infolge unserer Teilnahme an einer Malariastudienreise nach Italien unterbrochen werden. So können und wollen unsere Beobachtungen keineswegs einen Anspruch auf Vollständigkeit machen, und wir sind uns der Lücken voll bewußt. Sie sollen aber, vor allem noch durch die später zu veröffentlichenden diesjährigen Sommerbeobachtungen (Dr. Sfarčić) ergänzt werden, die voraussichtlich auch schon einen Rückschluß auf die Ergebnisse unserer bisher eingeführten Bekämpfungsmaßnahmen gestatten dürften.

Dalmatien zählt seit jeher zu den bekannten europäischen Malarialändern. Die frühere österreichische Regierung hatte, wie wir allenthalben im Lande erfuhren, bereits seit vielen Jahren vor dem Kriege der Malaria in Dalmatien ihre Aufmerksamkeit zugewandt und auch Bekämpfungsmaßnahmen eingeführt. Leider sind uns nicht alle Publikationen über ältere Malaria-Ermittlungen und -Arbeiten in Dalmatien aus der medizinischen Literatur bekannt bezw. zugängig geworden. Der Freundlichkeit von Herrn Prof. Mannaberg (Wien) verdanken wir jedoch die Einsichtnahme in ein Gutachten, das Prof. Mannaberg im Jahre 1910 dem Obersten Sanitätsrat in Wien erstattet hat. Aus diesem Gutachten ersehen wir, daß die „Malariaaktion im Küstenland und in Dalmatien" damals schon seit sieben Jahren durchgeführt worden war. Aus der Literatur sind Berichte über Istrien (1902), Pola (1903) und Brioni (1903) bekannt.

Mannaberg schreibt u. a.: „Die Berichte aus Dalmatien sind so wenig genau, daß ein sicheres Urteil über die therapeutischen Erfolge aus ihnen nicht zu bilden ist. — 1906 unterstanden der Aktion im ganzen 66 091 Seelen mit 43,6 Proz. Morbidität; es ereigneten sich 9714 Fälle von Rezidiv — also wohl Fieberfälle — das sind 15 Proz. der Bevölkerungsziffer. 1907 hatten 89 300 Seelen mit 43 Proz. Morbidität mindestens 8,6 Proz., wahrscheinlich aber gegen 19 Proz. Rezidive; 1908: 113 275 Seelen mit 39,2 Proz. Morbidität mindestens 7,3 Proz., wahrscheinlich aber gegen 18 Proz. Rezidive."

Die folgende Zusammenstellung ist auch von Interesse, obwohl sie sich nicht auf Resultate von mikroskopischen Blutuntersuchungen gründet:

Im Jahre 1903	kamen	5 825	Seelen mit	77	Proz. Kranken in Behandlung
„ „ 1904	„	23 876	„ „	67	„ „ „ „
„ „ 1905	„	55 010	„ „	49,4	„ „ „ „
„ „ 1906	„	66 091	„ „	43,6	„ „ „ „
„ „ 1907	„	89 300	„ „	43	„ „ „ „
„ „ 1908	„	113 275	„ „	39,2	„ „ „ „

Hierbei sind nur die Fälle gerechnet, die sich selbst den Endemieärzten stellten. Die Zahl der wirklichen Malariakranken verhielt sich daher anders, zumal da in Ermangelung von Blutuntersuchungen auch wohl nicht selten andere Fieber als Malaria mitgezählt wurden.

Immerhin glaubte Mannaberg damals nach mehrjähriger Aktion in Dalmatien schon einen „therapeutischen Erfolg" der Malariabekämpfung (Abnahme der totalen Mortalität, Vermehrung der Geburten reifer Früchte, Abnahme der Abortusfälle, gesteigerte Arbeitsfähigkeit der Bevölkerung) feststellen zu dürfen. „Von einem Dauererfolg konnte aber nirgends in Dalmatien die Rede sein". — Das durfte eigentlich nicht wundern, da — soweit aus Mannabergs Gutachten ersichtlich — damals in Dalmatien nur die sich freiwillig meldenden Kranken einer Chininbehandlung ohne intensive Nachbehandlung unterzogen wurden und nirgends prophylaktische, allgemein-hygienische und Mückenvertilgungsmaßnahmen zur Anwendung kamen.

Daher blieben in Dalmatien trotz alljährlicher Chininbehandlung durch Ärzte, Chininverteiler, Lehrer, Pfarrer usw. die alten Malariaherde bestehen und führten — nach zeitweiligem scheinbaren Nachlassen der Malaria — immer wieder zu Neuausbrüchen, so z. B. im Jahre 1907 in den Ortschaften Kozino, Boccagnazzo und Diklo, wo die Krankheit nach eingeleiteter Chininbekämpfung in den Jahren 1905 und 1906 schon nahezu erloschen schien.

Chininbehandlung der sich freiwillig meldenden Kranken allein hat — wenigstens in der damals angewandten Methodik — in Dalmatien nicht zu einem Dauererfolg geführt.

So war es auch nicht weiter zu verwundern, wenn während des Krieges und besonders nach Rückkehr der Kriegsteilnehmer aus verschiedenen Malariagegenden (Italien, Balkan, Palästina, Rußland) die Malaria sich in vielen Gegenden Dalmatiens wieder bedeutend vermehrte und die Aufmerksamkeit der jugoslavischen Regierung in vollstem Maße in Anspruch nahm. Kam es doch in den Nachkriegsjahren stellenweise zu Epidemien von einer Ausbreitung und Schwere, wie sie in den letzten Jahrzehnten nicht beobachtet worden waren.

Als Gründe für dieses erneute en- und epidemische Malariaauftreten in Dalmatien sind nach unserer Ansicht folgende anzusehen:

1) Weiterbestehen der alten einheimischen Herde (Parasitenträger). — 2) Vernachlässigung der Chininbehandlung der einheimischen Malariakranken (Chininmangel). — 3) Hinzukommen von neuen Parasitenträgern (namentlich Tropicaträgern). — 4) Herabsetzung der Widerstandsfähigkeit der Bevölkerung infolge schlechterer Ernährung in den letzten Kriegs- und Nachkriegsjahren (Verteuerung der Lebensmittel, Verschlechterung der sozialen Lage), dadurch erhöhte Empfänglichkeit für die Infektion. — 5) Vermehrung der übertragenden Anophelen in manchen Gegenden infolge Vernachlässigung der Bodenbearbeitung (Zunahme der Anophelesbrutplätze). — 6) Zweifellos auch die genaueren Ermittlungen und Feststellungen seit Einführung einer intensiveren Malariabekämpfung durch die jugoslavische Regierung und von Blutuntersuchungen in Malariastationen.

Zum ersten Male wurden in dankenswerter Weise die 1921 gesammelten Ermittlungen (mit Blutuntersuchungen) vom Gesundheitsamt in Split (Spalato) zusammengestellt und diese Beobachtungen im „Glasnik", Januar 1922, veröffentlicht. Dieser Bericht ist auch von Ivanić im „Archiv f. Schiffs- u. Tropenhyg." 1922, Nr. 9, kurz kritisch besprochen, wobei vor allem das zahlreiche Vorkommen

Tab. 1. Uebersicht über die im Herbst 1922 ausgeführten Blutuntersuchungen.

Nr.	Datum	Ort	Untersucht	Positiv	Unter den Positiven waren Tropica	Tertiana	Quartana	Doppelinfektionen
1	14. 9.	Marina	97	38 (39,2 %)	28 (73,7 %)	5 (13,15 %)	5 (13,15 %)	—
2	18. 9.	„	59	19 (32,2 „)	12 (63,2 „)	1 (5,2 „)	6 (31,6 „)	—
3	4. 10.	„	47	19 (49,4 „)	14 (73,7 „)	2 (10,5 „)	1 (5,3 „)	1 (5,3 %) Trop. + Tert
4	4. 10.	„ (Umgebg.)	5	—	—	—	—	—
5	23. 9.	Vid	109	29 (26,6 „)	18 (62,1 „)	4 (13,1 „)	7 (24,2 „)	—
6	22. 9	Metković (eine Häuserreihe)	41	21 (51,2 „)	20 (95,2 „)	1 (4,8 „)	—	—
7	22. 9.	Metković (Finanzkaserne)	12	4 (33,3 „)	3 (75 „)	—	1 (25 „)	—
8	22. 9.	Metković (Gymnasium)	63	13 (20,6 „)	10 (76,9 „)	2 (15,4 „)	1 (7,7 „)	—
9	24. 9.	Gabela	66	44 (66,6 „)	40 (90,9 „)	1 (2,3 „)	3 (6,8 „)	—
10	25. 9.	Novoselo	66	31 (46,9 „)	24 (77,9 „)	4 (12,4 „)	3 (9,7 „)	—
11	26. 9.	Opuzen	124	41 (33,1 „)	14 (34,1 „)	5 (12,2 „)	19 (46,3 „)	3 (7,3 %)
12	4. 10.	Sevid-Račice	200	53 (26,5 „)	23 (43.4 „)	15 (28,3 „)	14 (26,4 „)	1 (1,9 „) Tert. + Trop
13	6. 10.	Schule Cappele-Stafilić (Kinder)	80	3 (3,75 „)	2 (66,6 „)	1 (33,3 „)	—	—
14	9. 10.	Drvenik	76	39 (51,3 „)	32 (82,1 „)	5 (12,7 „)	1 (2,6 „)	1 (2,6 %) Quart. + Trop
15	8. 10.	Muć u. Umgeg.	28	20 (71,4 „)	11 (55 „)	5 (25 „)	4 (20 „)	—
16	11. 10.	Salona	3	2 (66,6 „)	1 (50 „)	1 (50 „)	—	—
17	13. 10.	Metković (Häuserreihe wie 6)	22	7 (31,7 „)	6 (85,7 „)	1 (14,3 „)	—	—
18	13. 10.	Positive aus Malariastation Metković	19	19 (100 „)	18 (94 7 „)	—	1 (5,3 „)	—
19	13. 10.	Positive aus Vid (Stat. Metković)	17	17 (100 „)	16 (94,1 „)	—	—	1 (5,9 %) Quart. + Trop.
20	13. 10.	Schule Metković	232	32 (13,8 „)	26 (81,3 „)	3 (9,4 „)	2 (6,2 „)	1 (3,1 %) Quart. + Trop.
21	14. 10.	Ambulanz Vid	36	12 (33,3 „)	12 (100 „)	—	—	—
22	14. 10.	Schule Vid	30	13 (43,3 „)	8 (61,5 „)	1 (7,7 „)	4 (30,8 „)	—
23	15. 10.	Ambul. Opuzen	259	73 (28,2 „)	30 (41,1 „)	8 (11 „)	35 (47,9 „)	—
24	16. 10.	Nachuntersuchungen Metković	17	5 (29,4 „)	4 (80 „)	1 (20 „)	—	—
25	16. 10.	Ambul. Metković	27	8 (29,6 „)	8 (100 „)	—	—	—
26	17. 10.	Vidonje	46	5 (10,9 „)	1 (20 „)	1 (20 „)	3 (60 „)	—
27	17. 10.	Dobranje	8	1 (12,6 „)	1 (100 „)	—	—	—
28	18. 10.	Sevid-Račice (Ambulanz)	97	30 (30,9 „)	14 (46,66 „)	2 (6,66 „)	14 (46,66 „)	—
29	18. 10.	Marina (Ambul.)	45	9 (20 „)	4 (44,4 „)	3 (33,3 „)	2 (22,3 „)	—
30	23. 10.	Schule Trogir	203	3 (1,5 „)	1 (33,3 „)	1 (33,3 „)	1 (33,3 „)	—
31	23. 10.	Dugopolje (Pos. aus Stat. Split)	24	24 (100 „)	17 (70,8 „)	5 (20,8 „)	—	2 (8,5 %) beide Tert. + Trop.
32	25. 10.	Schule Drniš	121	16 (13,2 „)	4 (25 „)	2 (12,5 „)	10 (62,5 „)	—
33	25. 10.	Mirilović-Zagora	32	1 (3,1 „)	—	—	1 (100 „)	—
34	26. 10.	Muć-Ramljane	39	24 (61,5 „)	9 (37,5 „)	3 (12,5 „)	12 (50 „)	—
35	26. 10.	Postinje	6	1 (16,6 „)	—	1 (100 „)	—	—
36	26. 10.	Bračević	9	5 (55,5 „)	2 (40 „)	2 (40 „)	1 (20 „)	—
37	28. 10.	Jadrtovac	36	5 (13,9 „)	3 (60 „)	1 (20 „)	1 (20 „)	—
38	28. 10.	Vrpolje	32	8 (25 „)	1 (12,5 „)	2 (25 „)	5 (62,5 „)	—
39	1. 11.	Dugopolje	51	34 (66,6 „)	24 (70,6 „)	10 (29,4 „)	—	—
40	1. 11.	Sevid-Račice	91	27 (23,1 „)	7 (33,3 „)	5 (23,8 „)	9 (42,9 „)	—
41	1. 11.	Marina (Ambul.)	28	4 (14,3 „)	2 (50 „)	1 (25 „)	1 (25 „)	—
42	31. 10.	Drniš (Ambul.)	25	10 (40 „)	3 (30 „)	3 (30 „)	4 (40 „)	—
43	3. 11.	Ambul. Trogir	19	5 (26,3 „)	3 (60 „)	—	2 (40 „)	—
		Summe	2667	768 (28,9 %)	476 (62,0 %)	108 (14,1 %)	174 (22,6 %)	10 (1,3 %)

von Quartana, zum Teil in ausgesprochenen Herden hervorgehoben wurde. Ivanić fand diese Quartanahäufigkeit — „falls nicht diagnostische Irrtümer vorliegen sollten" — für sehr bemerkenswert. Sie bedeutete zweifellos ein Novum in der Malariaepidemiologie der Adriaküste und forderte uns zu einer genauen Nachprüfung heraus.

I. Blutuntersuchungen.

Um ein möglichst gleichmäßiges und einwandfreies Bild über die Verteilung der 3 Malariaarten in Dalmatien zu gewinnen, wurden die sämtlichen Blutuntersuchungen des Jahres 1922 und 1923, von denen in diesem Berichte die Rede ist, von Mühlens selbst vorgenommen[1]) bezw. nach der durch Kollegen oder Helferinnen gemachten Voruntersuchung kontrolliert.

A. Blutuntersuchungen im Herbst 1922.

Die Resultate der im Herbst 1922 gemachten 2667 Blutuntersuchungen sind in Tabelle I (S. 329) zusammengestellt.

Aus der Zusammenstellung in Tab. I ergibt sich, daß zur Zeit unserer Untersuchungen (Mitte September bis Ende Oktober 1922) allenthalben die Malaria tropica bei weitem die höchsten Zahlen aufwies: Unter im ganzen von uns bei 2667 untersuchten Personen festgestellten 768 positiven Blutbefunden waren 476 (also 62 Proz. der Positiven) einwandfrei Malaria tropica.

Die höchsten Tropicaziffern zeigten Marina (73,7 Proz. der positiven Befunde), Metković (75—100 Proz. Mitte Oktober), Gabela (90,9 Proz.), Novoselo (77,4 Proz.), Drwenik (82,1 Proz.), Vid (61—100 Proz. Mitte Oktober) und Dugopolje (70,8 Proz.). Wohlgemerkt, diese Prozentzahlen beziehen sich nur auf die positiven Befunde, nicht auf die Gesamtbevölkerung.

Zur allgemeinen Durchuntersuchung der Gesamtbevölkerung fehlte es leider an Zeit und Hilfspersonal. Dagegen untersuchten wir stellenweise in Schulen sämtliche Kinder. Auch in Marina und in einer Häuserreihe in Metković wurde fast die ganze Einwohnerschaft untersucht, indem wir an mehreren Tagen von Haus zu Haus gingen und die Leute in den Wohnungen aufsuchten. Im übrigen aber mußten wir uns meist darauf beschränken, die zu den „Kommissionsterminen" erscheinenden oder die von uns zusammengerufenen Kranken und Verdächtigen zu untersuchen. Zweifellos hätten systematische Durchuntersuchungen ganzer Dörfer ein genaueres und wissenschaftlich wertvolleres Bild ergeben. — Aber auch so kann man sich aus unseren Zahlen schon einen Begriff über die Verteilung der 3 Malariaarten machen, am sichersten aus den Schuluntersuchungen.

Aus den in unserer Statistik zusammengestellten Zahlen ergibt sich, daß in vielen Orten Dalmatiens, zu denen (nach den Mitteilungen von Dr. Arneri in Sinj und nach den Untersuchungen der Malariastation in Split) noch Lučane hinzukam, im September bis Oktober 1922 die Tropica in stark epidemischer Form aufgetreten war, jedenfalls in einer Ausdehnung und Heftigkeit, wie sie der Bevölkerung in Marina, Vid, Metković, Gabela, Drvenik, Dugopolje, Lučane u. a.

1) Die Zahlen, auf die sich der im „Glasnik" veröffentlichte Bericht des Jahres 1921 gründet, stellen die Untersuchungsergebnisse einer ganzen Anzahl von untersuchenden, neu eingearbeiteten Ärzten und Helferinnen dar. Dies Material ist daher nicht einheitlich und eindeutig.

bisher noch nicht zum Bewußtsein gekommen war. Ohne Blutuntersuchungen wären diese Epidemien in ihrem Wesen sicher nicht so genau als Malaria tropica erkannt und die Krankheit zum Teil vielleicht für andere (Typhus, Grippe, Pneumonie, Meningitis usw.) gehalten worden.

Wir hörten von Aerzten und Laien von früheren Meningitis-Todesfällen unter Kindern, die vielleicht auch zur Tropica zu rechnen waren.

Gegenüber der Malária tropica traten die Tertiana und Quartana im Herbst weit zurück: Tertiana 14,1 Proz., und Quartana 22,6 Proz. der sämtlichen positiven Befunde (im einzelnen siehe Tab. I).

Vergleicht man unsere Zahlen mit denen der gleichen Monate des Vorjahres (siehe „Glasnik", Januar 1922, S. 52 ff.), so könnte man für manche Gegenden an eine Änderung des endemischen Typus denken, vorausgesetzt, daß — wie schon von Dr. Ivanić betont wurde — die Blutuntersuchungen im Jahre 1921 einwandfrei waren. Jedenfalls waren 1921 fast nirgends so hohe Tropica-Prozentzahlen festgestellt, wie wir sie in den gleichen Monaten 1922 an vielen Orten ermittelt hatten. Nur in Stobrić — wo wir 1922 nicht selbst untersucht hatten — waren im September 1921: 100 Proz., im Oktober: 75 Proz. und im November: 100 Proz. Tropica, in Strozanać in den gleichen Monaten 86 Proz., 55 Proz. bzw. 57 Proz. Tropica ermittelt worden. Die Blutpräparate aus diesen Orten waren in der Untersuchungsstation Split unter der Leitung von Dr. Bulat untersucht worden.

Demgegenüber lauten die mikroskopisch festgestellten Tropicazahlen für:

Metković:	September und Oktober 1921:	18	Tropica	gegenüber	24	Quartana
„	Juni bis Oktober 1921:	32	„	„	77	„
Vid:	September 1921:	10	„	„	14	„
„	Juni bis September 1921:	18	„	„	40	„
Marina:	September und Oktober 1921:	6	„	„	4	„
„	Juni bis Oktober 1921:	21	„	„	31	„

Auffallend ist bei den Untersuchungsergebnissen des Jahres 1921 auch der wesentlich höhere Prozentsatz an Doppelinfektionen, so z. B. in Metković unter 164 positiven 19 Doppelinfektionen, darunter 10 Tertiana und Quartana; im Oktober 1921 sogar 16 Proz., und in Trogir im gleichen Monat 26 Proz. Doppelinfektionen! Aus Metković waren sogar 3 Fälle mit allen 3 Parasitenarten gemeldet. — Demgegenüber fanden wir im Jahre 1922 unter 768 positiven nur 10 (= 1,3 Proz.) sichere Doppelinfektionen, meist Tertiana und Tropica, 3mal auch Quartana und Tropica, dagegen nie Tertiana und Quartana. Bei den meisten unserer Doppelinfektionen war die Tropica die ältere Infektion, d. h. es fanden sich einzelne Halbmonde neben den Schizonten und Gameten der Tertiana bzw. Quartana. Mühlens hatte schon früher darauf hingewiesen, daß sich Doppelinfektionen um so häufiger zu finden pflegen, je aufmerksamer man danach sucht. Diese Erfahrung wurde auch in diesem Jahre in Dalmatien wieder bestätigt: Im Mai und Juni/Juli 1922 fanden wir verhältnismäßig mehr Doppelinfektionen als im Herbst 1921: mitunter neben zahlreichen Tertianaparasiten nur einen oder wenige Halbmonde in parasitenreichen Präparaten, die wir nach kurzer Besichtigung zunächst als einfache Tertiana bezeichnet hatten. Damit soll aber nicht gesagt sein, daß wir die wesentlich höheren Zahlen der Doppelinfektionen des Jahres 1921 durch gründlichere Untersuchungen erklären wollen.

Das Studium der Frage der Doppelinfektionen, das bekanntlich für die Unitätsfrage des Malariaparasiten sehr wichtig ist, erfordert eine sehr gründliche und zeitraubende Unter-

suchung der Präparate sowie genaue Kenntnis der Parasitenformen, in Zweifelsfällen neben der Untersuchung im dicken Tropfen auch Untersuchung von Ausstrichpräparaten.

In dicken Tropfenpräparaten kommen, namentlich bei Ungeübten, zu leicht Verwechselungen der Parasitenformen vor. So ergab es sich bei vielen mit den Ärzten und letztjährigen Helferinnen vorgenommenen Blutuntersuchungen und Übungen sowie bei Kontrollen von manchen Präparaten aus 1921, daß zweifellos 1921 und zum Teil auch im Frühjahr und Sommer 1922 nicht selten irrtümlich Quartana diagnostiziert worden war in Blutpräparaten, in denen es sich zweifellos um reine Tropica (mitunter auch um Tertiana) handelte. Von manchen Untersucherinnen sind insbesondere die in langsam eingetrockneten dicken Tropfenpräparaten so häufigen abgerundeten sphärischen Tropica-Gametenformen oft mit Quartanagameten verwechselt und nicht selten auch Tertianagameten und -Ringe, ja selbst Tropicaringe für Quartanaparasiten gehalten worden. Ferner konnte Mühlens nachweisen, daß viele der diagnostizierten Doppel- und dreifachen Infektionen nur einfache bzw. Doppelinfektionen waren. Demnach muß unbedingt bei den Statistiken des Jahres 1921 ein „Irrtumskoeffizient“, namentlich für die Quartana, in Abzug gebracht werden. Wie hoch dieser Irrtumskoeffizient für 1921 sein mag, läßt sich natürlich nachträglich unmöglich abschätzen. Immerhin dürfte er in manchen Gegenden mindestens 10—20 Proz., selbst mehr betragen haben, namentlich auch bei den unverhältnismäßig zahlreich diagnostizierten Doppelinfektionen.

Aber selbst unter Anrechnung eines solchen Irrtumskoeffizienten bleibt die auch durch unsere Ermittelungen bestätigte Tatsache bestehen, daß die Malaria quartana in Dalmatien im Vergleich mit anderen europäischen Ländern auffallend stark verbreitet ist und eine wichtige Rolle spielt.

Die größte Verbreitung hatte jedoch, wie schon gesagt, in den Spätsommer- und Herbstmonaten ohne Zweifel in den meisten Gegenden die Malaria tropica. Möglich, daß 1922 an alten Herden die Tropica wesentlich in- und extensiver aufgetreten ist als 1921 und auch in früheren Jahren, und daß zu den alten Herden neue hinzugekommen sind (z. B. Dugopolje, Drvenik, Lučane). Möglich aber auch, daß die genaueren Blutuntersuchungen des Jahres 1922 mit zu den höheren Tropicazahlen verholfen haben, zum Teil in Fällen, die — mit kontinuierlichem Fiebertypus — vielleicht früher für andere Fieber gehalten worden waren.

Besonders erschreckend waren die Tropicazahlen in Metković und Umgegend. In einer Häuserreihe daselbst, unmittelbar am rechten Narentaufer gelegen, flußaufwärts an der Brücke beginnend, entnahmen wir am 22. Sept. von 41 anwesenden Bewohnern ohne Auswahl Blutproben; davon waren 21 (51,2 Proz.) positiv, und unter diesen 20 (= 95,2 Proz.) Tropica und nur 1 (= 4,8 Proz.) Tertiana. In einem Hause, dem sog. „Armenhaus“, waren von 11 Untersuchten 10 infiziert. Nicht viel geringer war der Tropica-Prozentsatz bei einer späteren Untersuchung in derselben Häuserreihe am 13. Okt., nämlich 85,7 Proz. — Zur gleichen Zeit waren von 19 in der Malariastation Metković festgestellten positiven Fällen aus Metković 18 (= 94,7 Proz.), und von 17 positiven Fällen aus Vid 16 (= 94,1 Proz.) Malaria tropica-Infektionen. — Am 14. Okt. erwiesen sich von 36 in der Ambulanz Vid Untersuchten 12 als positiv, sämtlich Malaria tropica, und am 16. Okt. sämtliche 8 von uns in der Ambulanz Metković festgestellten positiven Fälle aus Metković.

Interessant sind auch die Ergebnisse der Schuluntersuchungen in Metković und Vid: Im Gymnasium in Metković waren am 22. September von 63 anwesenden Schülern 13 (20,6 Proz.) positiv, darunter: 10 (76,9 Proz.)

Tropica, 2 Tertiana und 1 Quartana. — In der Volksschule in Metković wurden am 13. 10. alle 232 Kinder untersucht, darunter 32 (13,8 Proz.) positive Befunde: unter diesen 26 (81,3 Proz.) Tropica. — Von 30 am 14. 10. untersuchten Schulkindern in Vid hatten 13 (43,3 Proz.) Parasiten im Blute, darunter 8 (61,5 Proz.) Malaria tropica, 4 (30,8 Proz.) Malaria quartana und 1 (7,7 Proz.) Malaria tertiana.

Bei allen diesen genannten, schon sehr hohen Tropicazahlen ist zu bedenken, daß es sich dabei nur um positiv festgestellte Parasitennachweise, also um Minimalzahlen handelt. In Wirklichkeit mußten nach allen Erfahrungen und auch nach den Milzuntersuchungen zu urteilen (vgl. später), noch höhere Infektionszahlen angenommen werden. Dasselbe gilt natürlich auch von den Quartana- und Tertiana-Infektionen.

In den Monaten September und Oktober 1922 fanden wir prozentual am meisten Quartanainfektionen in Opuzen: nämlich am 26. 9. 46,3 Proz. unter 41 Positiven von 124 Untersuchten, und am 15. 10. 47,9 Proz. unter 73 Positiven von 259 Untersuchten; ferner in Drniš: am 25. 10. unter 16 Positiven von 121 untersuchten Schulkindern 10 (= 62,5 Proz.) Quartana. Weiterhin wurden in Sevid Račice am 18. 10. 46,6 Proz., und am 1. 11. 42,9 Proz. Quartanainfektionen unter den Positiven festgestellt. Auch in Vidonje und Vrpolje ergaben sich (bei geringerem Untersuchungsmaterial) 60 Proz. bzw. 62,5 Proz. Quartana, und in Muč-Ramljane 50 Proz. von 24 Positiven unter 39 Untersuchten.

Die höchsten Tertianazahlen ergaben die Untersuchungen vom 4. Okt. bis 1. Nov. in Sevid-Račice (28,3 Proz. bzw. 23,8 Proz. der Positiven), und in Dugopolje am 28. Okt. 20,8 Proz. und am 1. Nov. 29,4 Proz. Die anderen Resultate sind wegen zu geringer Zahl der Untersuchten nicht zu verwerten.

Bekanntlich tritt in den Ländern mit endemischer Malaria die Tertiana am häufigsten in den Frühjahrs- und Frühsommermonaten auf und im Herbst gegenüber der Tropica wesentlich zurück. Die Quartana pflegt auch in den kühleren Frühjahrs- und namentlich Herbst- und selbst Wintermonaten häufiger zu sein. Diese Erfahrungen konnten auch zum größten Teil in Dalmatien wieder bestätigt werden.

Wie zu erwarten, war das Parasitenbild im Frühjahr und Sommer 1923 ein wesentlich anderes.

Wenn nach dem Vorstehenden unsere tabellarisch zusammengestellten „Stichproben" einen Einblick in das annähernde Verhältnis der 3 Malariaarten in verschiedenen Gegenden Dalmatiens gestatten und auch sonst einige interessante Tatsachen ergeben, so zeigen sie uns doch nicht einen absolut einwandfreien „Parasitenindex" für alle Gegenden. Um einen solchen zu erhalten, hätte die gesamte Bevölkerung in bestimmten Bezirken jeweils untersucht werden müssen. Zu derartigen Ermittelungen fehlten uns aber Zeit und Hilfskräfte. Unsere Aufgabe war ja, in erster Linie die Wege für eine praktische Bekämpfung der Malaria in Dalmatien zu ermitteln. Hierzu waren noch viele andere wichtige Fragen, namentlich epidemiologischer Art und die Anopheles-Frage eingehend zu studieren. Ronald Ross[1]), einer der bekanntesten Malariapraktiker, sagt:

1) In: „Malaria", Internat. Arch. Bd. 1. 1909.

„Die Untersuchung des Blutes auf Parasiten kommt als praktische Maßregel beinahe nicht in Frage, wenn man bedenkt, wieviel Zeit für die Untersuchung jedes Präparates verwendet werden muß. Wir müssen uns selbstverständlich bemühen, statistische Fehler zu vermeiden, das heißt, es müssen sehr viele Fälle untersucht werden, und dies gibt einer handlichen, wenn auch etwas ungenaueren Prüfung gegenüber einer genauen, aber schwierigen, den Vorzug."

Hinzu kommen noch gewisse Fehler bei den Blutuntersuchungen: Nicht selten finden sich, selbst im dicken Tropfen, trotz bestehender chronischer Infektion keine Parasiten im peripheren Blut. So geben also die Blutuntersuchungen ohnehin einen zu geringen Index, d. h. also nur Minimalzahlen. Und als solche bitten wir auch unsere Zahlen anzusehen, die vor den statistischen Zusammenstellungen im letzten veröffentlichten Jahresbericht immerhin den Vorzug haben, daß sie einheitlich von einem alten Malariakenner und nicht von verschiedenen jüngeren, mehr oder minder geübten Mikroskopikern in verschiedenen Landesteilen untersucht sind.

B. Blutuntersuchungen im Frühjahr und Sommer 1923.

1923 konnten wegen zu großer Inanspruchnahme durch andere, namentlich epidemiologische, insbesondere Mückenuntersuchungen und Bekämpfungsmaßnahmen, nicht so viele Blutuntersuchungen von uns selbst gemacht werden wie im Jahre 1922. Die Resultate sind in Tabelle II (S. 335) zusammengestellt.

Aus einem Blick auf die Tab. II ersieht man, daß das Verhältnis der Parasitenarten zueinander in den Monaten Mai bis Mitte Juli 1923 ein ganz anderes war als in den Herbstmonaten 1923.

Diesmal ergab die Malaria tertiana die höchsten Zahlen: nämlich 62 (= 52,1 Proz.) von 119 positiven Befunden unter 856 untersuchten Personen. Nächstdem kam die Quartana mit 36 (= 30,3 Proz.), und dann erst die Tropica mit 16 (= 13,4 Proz.) Parasitenbefunden. In 5 (4,2 Proz.) Fällen handelte es sich um Doppelinfektionen, und zwar 4mal Tertiana und Tropica, und einmal Quartana und Tropica; dabei waren die Tropicaparasiten nur Gameten.

Die meisten Tertianainfektionen wurden auf der Insel Drvenik und in Lučane bei Sinj nachgewiesen: auf Drvenik an 3 verschiedenen Untersuchungstagen 85,7—100 Proz., und in Lučane 75 Proz.; beides Plätze, an denen im Herbst 1922 umgekehrt ähnlich hohe Prozentzahlen von Tropicainfektionen (daneben nur wenig Tertiana) festgestellt waren. In Lučane hatten wir zwar 1922 nicht selbst untersucht. Jedoch konnten wir uns in der Untersuchungsstation Split über die diesbezüglichen Resultate unterrichten.

Beide Orte (Drvenik und Lučane) waren 1922, vielleicht zum ersten Male, in heftigster Weise (ähnlich wie Dugopolje) von Tropica heimgesucht worden, nachdem früher schon die „Tertiana" (auch im Volksmund so genannt) dort bekannt gewesen war. An beiden Plätzen wurden im Herbst auch Tertianainfektionen (in Drwenik 12,7 Proz.) nachgewiesen, in Drwenik auch 1 Quartanafall. Es handelte sich um denselben Patienten, der auch im Oktober 1922 als einziger Quartanafall unter 39 Positiven auf Drwenik von uns ermittelt worden war (er hatte außerdem auch schon im August 1922 bei Untersuchung durch Herrn Dr. Sfarčić Quartanaparasiten).

Der diesjährige Tropicafall auf Drvenik (einzelne Ringe und Halbmonde) hatte auch am 9. 10. 1922 Tropicaparasiten (Halbmonde).

Tabelle II.
Uebersicht über die in den Monaten Mai—Juli 1923 ausgeführten eigenen Blutuntersuchungen.

Datum	Ort	Untersucht	Positiv	Unter dsn Positiven waren			Doppelinfektionen
				Tropica	Tertiana	Quartana	
5. 5.	Marina	10	—	—	—	—	—
6. 5.	Bristeviza	11	2 (18,2 %)	—	2 (100 %)	—	—
9. 5.	Drvenik	46	14 (30,4 „)	1 (7,1 %)	12 (85,7 „)	1 (7,1 %)	—
16. 5.	Opuzen	100	10 (10 „)	1 (10 „)	1 (10 „)	8 (80 „)	—
16. 5.	Vid (Schule)	33	9 (27,3 „)	4 (44,4 „)	—	4 (44,4 „)	1 (11,1 %) (Quart.+Trop.)
17. 5.	Metković, Schule (nur Verdächt.)	66	6 (9,1 „)	1 (16,7 „)	1 (16,7 „)	4 (66,6 „)	—
	Summe Mai	266	41 (15,4 %)	7 (17,1 %)	16 (39 %)	17 (41,4 %)	1 (2,5 %) (Quart.+Trop.)
19. bis 26. 6.	Trogir, Ambul. (teils Umgeb.)	100	11 (11 %)	2 (18,2 %)	4 (36,4 %)	5 (45,4 %)	—
20. 6.	Drvenik	18	6 (33,3 „)	—	6 (100 „)	—	—
20. u. 24. 6.	Viniščé	96	10 (10,4 „)	1 (10 „)	3 (30 „)	6 (60 „)	—
23. 6.	Marina (Schule)	49	4 (8,2 „)	—	2 (50 „)	2 (50 „)	—
26 6.	Okruk (Schule)	36	0	—	—	—	—
28. 6.	Sevid-Račice	17	0	—	—	—	—
28. 6.	Zeget	11	0	—	—	—	—
28. 6.	Ambul. Trogir	11	0	—	—	—	—
28. 6.	Marina	5	0	—	—	—	—
	Summe Ende Juni	343	31 (9 %)	3 (9,7 %)	15 (48,4 %)	13 (41,9 %)	—
4. 7.	Vid	9	1 (11,1 %)	—	—	1 (100 %)	—
5. 7.	Metković (Häus.)	20	3 (15 „)	1 (33,3 %)	1 (33,3 %)	1 (33,3 „)	—
9. 7.	Novoselo	8	1 (12,5 „)	—	—	1 (100 „)	—
9. 7.	Gabela	29	1 (3,5 „)	1 (100 „)	—	—	—
10. 7.	Ambul. Metković	11	2 (18,2 „)	1 (50 „)	—	1 (50 „)	—
9. 7.	Drvenik	53	11 (20,8 „)	—	10 (90,8 „)	—	1 (9,1 %) (Tert.+Trop.)
9. 7.	Viniščé	56	4 (7,1 „)	—	2 (50 „)	2 (50 „)	—
11. 7.	Lučane	61	24 (39,3 „)	3 (12,5 „)	18 (75,0 „)	—	3 (12,5 %) (Tert.+Trop.)
	mme erste Hälfte Juli	247	47 (19,0 %)	6 (12,8 %)	31 (66 %)	6 (12,8 %)	4 (8,3 %)
	Summe Mai/Juli	856	119 (13,9 %)	16 (13,4 %)	62 (52,1 %)	36 (30,3 %)	5 (4,2 %) (4 Tert.+Trop., 1 Quart+Trop.)

Ein Vergleich der diesjährigen Tertianafälle auf Drvenik mit den Untersuchungen im Oktober 1922 ergibt folgendes: zwei der Fälle waren am 9. Okt. 1922 negativ gewesen (in Liste steht „Pigment“ notiert); einer zeigte am 9. 10. den gleichen positiven Befund, ein diesjähriger Tertianafall hatte am 9. 10. 1922 Tropica-Halbmonde. Die anderen diesjährigen positiven Tertianafälle waren in den Listen des Jahres 1922 nicht aufgeführt, also damals (im August und Oktober) nicht untersucht worden und wahrscheinlich auch nicht krank gewesen.

Somit kommt man zu der Vermutung, daß es sich bei den diesjährigen Fällen teils um Tertianarezidive vom vorigen Frühsommer, teils um diesjährige Neuinfektionen handeln mußte, daß also im Früh-

jahr und Frühsommer auf Drvenik die Tertiana und im Spätsommer und Herbst die Tropica überwiegt.

Den Gedanken einer eventuellen Anpassung bzw. Umwandlung der Parasitenformen je nach der Jahreszeit im Sinne der Unitarier lehnen wir ab. Gerade der im Herbst und Frühjahr nachgewiesene einzige Quartanafall auf Drvenik spricht gegen eine solche. Warum sollte sich denn nicht auch die Quartana umwandeln? Auch in Metković konnten wir feststellen, daß ein Schulkind, das im Oktober 1922 mit Quartana + Tropica infiziert war, im Mai 1923 immer noch Quartanaparasiten hatte.

Von italienischer Seite wird neuerdings eine Beobachtung im Sinne des Unitarismus vermerkt, nämlich die, daß in den italienischen Gegenden mit Malaria tropica in der Übergangszeit vor der Tropicasaison keine Halbmondträger nachzuweisen seien (mündliche Mitteilung Grassis). Demgegenüber verweisen wir auf frühere Beobachtungen von Mühlens in Palästina u. a., sowie auf unsere diesjährigen Beobachtungen in Dalmatien: In unseren Malariastationen wurden in allen Monaten des Winters, Frühjahrs und Frühsommers Halbmondträger und auch im Mai und Juni schon einzelne Tropicarezidive bezw. Neuerkrankungen mit Schizonten nachgewiesen. Allerdings nahm die Zahl der Halbmondträger in den Monaten Mai bis Juni gegenüber den Herbst- und Wintermonaten ab. Halbmondträger fanden sich u. a. auch bei frischen Infektionen und Rezidiven von Tertiana und Quartana, offenbar herrührend von einer früheren, zur Zeit latenten Tropicainfektion. Somit sprechen unsere dalmatinischen Beobachtungen der ununterbrochenen Tropica-Parasitenträger-Kette in dem Sinne, daß auch die Tropicaparasiten im Menschen „überwintern", ohne sich in andere Formen umzuwandeln (vgl. auch die auf S. 334 u. 344 beschriebenen Fälle).

Auch folgende Untersuchungen sprechen gegen den Unitarismus:

In Dugopolje, wo im Herbst 1922 neben Tertianainfektionen eine heftige Tropicaepidemie aufgetreten und keine Quartana gefunden war, ergaben die von der Malariastation Split ausgeführten diesjährigen Untersuchungen auch zahlreiche Frühjahrs- bezw. Frühsommer-Tertianafälle, daneben aber auch in allen Monaten Halbmondträger.

In Lučane, wo ebenfalls im letzten Herbst eine heftige Tropicaepidemie herrschte, wurden am 11. 7. 1923 unter 61 Untersuchten 18 (75,0 Proz.) Tertiana-, 3 (12,5 Proz.) Tropica- und 3 (12,5 Proz.) Doppelinfektionen (Tertiana + Tropica) festgestellt, dagegen keine Quartana.

Im Gegensatz zu diesen Orten (Drvenik, Dugopolje, Lučane) mit fast ausschließlich Tertiana- und Tropicainfektionen zu verschiedenen Jahreszeiten stehen andere, in denen auch die Quartana eine wichtige, zeitweilig gar die Hauptrolle spielte und zu allen Jahreszeiten nachzuweisen war, so z. B. in Opuzen, Vid und Vinišće. In diesen Orten war hingegen die Tertiana wesentlich seltener. In Metković, wo wir im Herbst 1922 überwiegend Tropica hatten, schien im Frühjahr 1923 die Quartana häufiger zu sein als Tertiana.

Wir fanden also Orte (ohne Quartana) mit vorwiegend Tertianaparasiten im Frühjahr und Sommerbeginn, und fast ausschließlich Tropicaformen im Spätsommer und Herbst, daneben auch in allen diesen Jahreszeiten mitunter Doppelinfektionen mit beiden Arten, andererseits aber auch Orte mit überwiegend Quartanaparasiten im Frühjahr und mehr Tropica im Herbst, und schließlich auch (am häufigsten) Plätze, an denen alle 3 Arten das ganze Jahr hindurch in wechselnder Zahl nebeneinander vorkommen; im Herbst mehr Tropicaparasiten, im Frühjahr mehr die beiden anderen Formen.

Diese Tatsachen vermögen wir nicht im Sinne des Unitarismus zu deuten, auch nicht Fälle, in denen auf einen Parasitentypus ein anderer folgte. Nach den von Mühlens angeregten Beobachtungen bei künstlichen Infektionen von

Paralytikern in Hamburg sind wir vielmehr der Ansicht, daß es sich dabei um Doppelinfektionen mit 2 Parasitenarten handelt, bei denen die eine die andere zurückdrängt: So sah Mühlens, daß — auch im Winter — bei gleichzeitiger Infektion mit Tertiana + Tropicaparasiten auch bei dem Infizieren beide Typen auftraten, die Tropica aber schließlich das Bild beherrschte und die Tertiana verdrängte. Bei gleichzeitiger intravenöser Infektion mit Tertiana und Quartana überwog die Tertiana und verdrängte die Quartanaparasiten aus dem peripheren Blut.

Irgendwelche „Uebergangsformen" von einer Malariaart in eine andere haben wir nie gesehen. Wir konnten vielmehr in den dicken Tropfenpräparaten (event. bei Zweifeln unter Zuhilfenahme des Ausstrichs) die 3 Parasitenarten stets gut unterscheiden. In Zweifelsfällen bewährte sich insbesondere auch die Untersuchung am Rande der dicken Tropfen, da, wo diese dünner sind. Dort findet man die Tertianaparasiten häufig in gut erhaltenen, dunkler gefärbten und event. getüpfelten roten Blutkörperchen, sowie auch die Halbmonde in ihrer charakteristischen Form deutlich erkennbar. Auch lassen sich am Rande der Präparate Tertiana- und Quartanaparasiten meist leicht unterscheiden.

In 2 Fällen von schweren Tropicainfektionen sahen wir (Herbst 1922) im peripheren Blut auch die Uebergänge zwischen Ringen und Teilungsformen sowie zu Halbmonden. Diese Formen hatten zum Teil große Aehnlichkeit mit Tropicakulturformen, besonders zahlreich in einem Präparat, das $^1/_2$ Std. vor dem Tode des Patienten entnommen war. Die so seltenen Parasiten waren von den ersten Untersuchern für Quartanaparasiten gehalten worden. Sie hatten auch eine gewisse Aehnlichkeit mit denselben, unterschieden sich jedoch für den Kenner deutlich durch ihr zusammengeballtes, massiges Pigment schon bei jüngeren Parasiten und den frühzeitigen Kernteilungsbeginn. Aehnliche Formen hatte Mühlens auch früher schon in Palästina und in Präparaten Seyfarths aus Mazedonien sowie unlängst in einem schweren Tropicafall im Hamburger Tropeninstitut gesehen. Sie scheinen nur selten und nur in ganz bedrohlichen Fällen ins periphere Blut zu gelangen.

Das Verhältnis der Schizonten zu den Gameten war je nach den Jahreszeiten und dem Krankheitsstadium verschieden. Die zahlreichsten Schizonten fanden sich bei frischen Infektionen, namentlich bei Tropica. Wir fanden — ähnlich wie früher in den malariareichsten Ländern (z. B. Palästina, Mazedonien, Südsee u. a.) — mitunter Infektionen, bei denen das Blut mit Tropicaringen (bis zu 4—5 in einem Blutkörperchen) übersät war. Dicke Tropfenpräparate sahen nicht selten wie Reinkulturen von Tropicaringen aus, indem ein Ring dicht neben dem anderen lag (weit über 100 in einem Gesichtsfeld). Aber auch bei Tertiananeuinfektionen und selbst bei Rückfällen von Tertiana und Tropica waren die Parasiten häufig sehr zahlreich. Und sogar nicht selten fanden wir Quartanafälle, in denen wir im dicken Tropfen bis zu 10—12 und mitunter noch mehr Parasiten in einem Gesichtsfeld zählen konnten. Vor allem lassen sich derartige Parasitenmengen häufig bei Kindern, selbst unter einem Jahre, feststellen. So sahen wir im Juni 1923 ein 10monatiges Kind aus Vinišće mit unendlich vielen Tropicaringen. Da es sich nach der Anamnese kaum um eine Infektion vom Vorjahre handeln konnte, so sprach dieser Fall zugleich für die Möglichkeit der Neuinfektion mit Tropica schon im Juni; und, da wir auch in den voraufgegangenen Monaten allenthalben Tropica-Halbmondträger feststellen konnten, also auch für

eine ununterbrochene Kontuinuität des Tropica-Entwicklungskreislaufs.

Unter den im Mai ermittelten positiven Befunden befanden sich relativ mehr Fälle mit zahlreichen (manche mit nur) Gameten als z. B. im Juli und September. Selbstverständlich hatten diese Kranken auch meist mehr oder minder viele Gameten. Besonders aber sahen wir im Oktober Blutbefunde, bei denen die Tropica-Gameten (bis zu 15 und mehr) in einem Gesichtsfeld des dicken Tropfens vollkommen das Bild beherrschten. Und auch in den ersten Wintermonaten bis Januar waren die Halbmonde oft noch sehr zahlreich, um alsdann mehr und mehr an Zahl abzunehmen und schließlich in vielen Fällen ganz aus dem peripheren Blut zu verschwinden. Immerhin blieben aber — wie schon auf S. 336 hervorgehoben — auch in den Übergangsmonaten Mai/Juni stets einige Halbmondträger nachweisbar, wenn auch während dieser Monate relativ weniger als Tertiana- und Quartana-Gametenträger.

II. Geschlecht und Alter der Infizierten.

Bezüglich des Geschlechts der Infizierten im Jahre 1922 zeigten sich keine erheblichen Unterschiede, wie sich aus der folgenden Zusammenstellung ergibt:

Tabelle III.
Geschlecht der Infizierten im Herbst 1922.

	Männlich			Weiblich		
	untersucht	positiv	negativ	untersucht	positiv	negativ
Marina u. Umgebung	155	42	113	120	41	79
Vid	77	21	56	66	20	46
Vid, Schule	25	8	17	5	5	—
Metković	41	19	22	18	6	12
„ (Schule)	132	19	113	100	13	87
„ (Gymnasium)	61	13	48	17	3	14
Opuzen	204	57	147	180	58	122
Sevid-Raćice	213	66	147	109	35	74
Drvenik	20	10	10	56	29	27
Cappele Stafilić (Schul.)	36	3	33	44	—	44
Trogir (Schule)	125	2	123	79	1	78
Drniš (Schule)	67	11	56	54	5	49
Dugopolje	39	28	11	12	6	6
Muć und Umgegend	16	11	5	12	9	3
Gabela	39	24	15	27	20	7
Novo-Selo	49	22	27	21	9	12
Vrpolje	22	5	17	10	3	7
Jadrtovac	15	4	11	21	1	20
Ramljane-Postinje	34	20	14	19	10	9
Vidonje-Dobranje	46	3	43	8	1	7
Summe	1416	388	1028	978	275	703

Von 1416 untersuchten männlichen Personen waren 388 (= 26,7 %) und
„ 978 „ weiblichen „ „ 275 (= 28,0 „) infiziert.

Das Alter der Infizierten ersieht man aus Tabelle IV (S. 339).

Demnach betrafen die meisten von den 661 positiven Infektionen Kinder im Alter von 1—15 Jahren: allein 352 (53,2 Proz.), also mehr als die Hälfte aller positiven Fälle. Dabei ist jedoch zu bedenken, daß die Zahl der untersuchten Kinder durch verschiedene Schuluntersuchungen verhältnismäßig höher war als die der untersuchten Erwachsenen. Die Tabelle zeigt aber auch,

Tabelle IV. Alter der positiven Fälle 1922.

	Untersucht	bis 5 Jahre	6—10 Jahre	11—15 Jahre	16—20 Jahre	21—30 Jahre	31—40 Jahre	41—50 Jahre	51—60 Jahre	61—70 Jahre	über70 Jahre
1) **Marina u. Umgeg.**	91	23	14	20	8	4	11	9	2	—	—
2) **Vid**	41	4	4	10	4	6	6	1	4	2	—
3) **„ (Schule)**	13	—	9	4	—	—	—	—	—	—	—
4) **Metković**	25	4	3	3	—	10	2	1	1	1	—
5) **„ (Schule)**	32	—	28	4	—	—	—	—	—	—	—
6) **„ (Gymn.)**	16	—	—	16	—	—	—	—	—	—	—
7) **Opuzen**	110	7	22	33	13	21	7	2	2	2	1
8) **Sevid-Račice**	101	9	17	25	10	17	12	6	3	2	—
9) **Drvenik**	39	7	4	6	5	8	3	1	4	1	—
10) **Drniš**	16	—	13	3	—	—	—	—	—	—	—
11) **Dugopolje**	34	3	2	11	2	8	5	1	2	—	—
12) **Muć u. Umgegend**	20	1	—	2	4	6	1	5	—	1	—
13) **Gabela**	43	4	3	7	5	11	9	3	1	—	—
14) **Novo-Selo**	31	1	4	6	9	5	3	2	1	—	—
15) **Vrpolje u. Jadrtovac**	13	3	1	2	—	4	—	2	1	—	—
16) **Ramljane-Postinje**	30	1	2	5	8	3	3	3	3	2	—
17) **Vidonje-Dobranje**	6	—	1	1	2	—	—	1	1	—	—
Summe	661	67	127	158	70	102	62	37	25	11	1

daß Erwachsene, selbst Greise gegen die Infektion nicht immun waren, wenn auch die Zahl der Infektionen im höheren Alter geringer schien. Unsere Zahlen können nicht allgemein als eigentliche Prozentzahlen für den Infektionsindex der betreffenden Altersstufen angesehen werden, sondern zeigen nur das Verhältnis der positiven Fälle in verschiedenem Alter zueinander.

Die älteste Kranke (in Opuzen) mit Quartana, war 86 Jahre alt; das jüngste infizierte Kind (in Metković) 5 Monate, mit Tropicaringen. 3 Greise hatten im Alter von 70 Jahren noch Parasiten. Positiv waren auch 12 Säuglinge, die 1 Jahr und weniger alt waren, darunter Kinder mit vielen Halbmonden und auch solche mit vielen Tropicaringen. Ein Kind im Alter von 10 Monaten hatte unzählige Ringe (+++++) im Blutpräparat. Auch im Juni 1923 beobachteten wir einen derartigen Fall. Nur je einer von den 12 Säuglingen war mit Quartana und Tertiana infiziert, die sämtlichen anderen mit Tropica, die meisten aus Marina.

Wie Mühlens schon an einer anderen Stelle betont hat, ist auch nach unseren Zahlen mit relativ vielen Infektionen in den ersten Lebensjahren die Ansicht von Falk („Malaria im Kindesalter", Med. Klin. 1922, Nr. 37) irrig, nach der „im Gegensatz zu den Tropenländern die Malaria des frühen Kindesalters in Europa zu den Seltenheiten" gehören soll. Wir sind vielmehr auf Grund eigener Feststellungen (auch in anderen europäischen Malariagegenden) der Ansicht, daß die Malaria bei Kindern, selbst Säuglingen, viel häufiger vorkommt, als sie diagnostiziert wird. Davon kann man sich durch systematische Blutuntersuchungen bei Kindern in endemischen Malariagegenden leicht überzeugen.

Nach unseren Untersuchungslisten, auf deren ausführliche Wiedergabe wir verzichten müssen, scheint es ferner, als ob Tertiana- und Quartanainfektionen bei Erwachsenen jenseits der vierziger Jahre relativ seltener gefunden werden als Tropicaparasiten, die in allen Altern häufig vorkommen, am zahlreichsten allerdings in den Kindheitsjahren (ebenso wie Tertiana und Quartana). So gehörten 434 dem Alter nach zusammengestellte positive Fälle aus den am meisten verseuchten Orten Marina, Vid, Opuzen, Drvenik, Sevid-Račice, Dugopolje zu folgendem Alter:

Tabelle V. Alter bei den 3 Malariaarten.

	insgesamt	bis 10 Jahren	11—20 Jahren	21—30 Jahren	31—40 Jahren	41—50 Jahren	51—60 Jahren	61—70 Jahren	71—90 Jahren
Tropica	244	62	82	35	32	18	12	3	—
Tertiana	66	25	24	8	2	3	1	3	—
Quartana	124	36	51	21	10	1	3	1	1
Summe	434	123	157	64	44	22	16	7	1

Von 66 Tertianafällen waren also nur	7 (= 10,6 Proz.)	jenseits	40	Jahren
„ 124 Quartanafällen „ „ „	6 (= 4,8 Proz.)	„	40	„
„ 244 Tropicafällen „ dagegen	33 (= 13,5 Proz.)	„	40	„
Von 434 Gesamtfällen waren	46 (= 10,6 Proz.)	über	40	Jahre

Das könnte so ausgelegt werden, daß die Tropica vielfach die neuere Infektion ist und daß namentlich gegen die länger und intensiver einheimische Quartana in höherem Alter eine größere Widerstandsfähigkeit (relative Immunität) besteht.

III. Milzuntersuchungen.

In den meisten Fällen, namentlich bei den Schulkinderuntersuchungen, untersuchten wir auch die Milz. Die Palpation wurde in der Weise vorgenommen, daß — nach möglichster Entspannung der Bauchdecken durch Vornüberbeugen — mit den Fingerspitzen der linken Hand von oben unter den Rippenbogen eingegangen wurde und man nun den Patienten tief Luft holen ließ. Die Milzbefunde sind in unserer Liste mit „I—VII" bezeichnet, wobei diese Zahlen die Fingerbreiten angeben, um die die Milz bei tiefer Atmung den Rippenbogen überragte. „VI" bedeutet „über Handbreite" und mit „VII" sind die enorm großen Milzen bezeichnet, die die ganze linke Bauchseite einnahmen und nach rechts auch noch die Linea alba überragten. „±" bedeutet: undeutliche Resistenz in der Milzgegend, deren Art wegen starker Spannung der Bauchdecken nicht bestimmt festzustellen war. Unsere in der Tabelle VI zusammengestellten Milzbefunde haben gegenüber anderen Statistiken den Vorteil, daß sie — ebenso wie die Blutuntersuchungen — einheitlich durch eine Hand (außer denen in Novo-Selo, die ein russischer Kollege gemacht hatte) vorgenommen wurden. So hohe Zahlen wie von diesem in Novo-Selo (fast 100 Proz.) wurden von uns nirgends gefunden. Auch konnten wir die enorm hohen Milzindexzahlen des Vorjahres (über 80 Proz.) nicht bestätigen.

Tabelle VI.
Übersicht über die Milzuntersuchungen im Herbst 1922.

Milzgröße	Marina	Vid	Schule Vid	Metković, Ambulanz	Gabela	Novo-Selo	Opuzen	Sevid-Račice	Drvenik	Schule Metković	Gymnasium Metković	Vidonje und Dobranje	Muć u. Umgebung	Schule Drniš	Jadrtovac	Vrpolje	Dugopolje	Summe
M I	60	27	7	14	24	15	157	85	27	25	8	29	19	23	10	15	15	560
M II	29	17	6	8	9	24	68	33	4	3	2	3	14	5	3	4	9	241
M III	11	6	2	4	8	17	16	14	3	1	2	2	11	—	2	2	1	102
M IV	3	1	—	2	3	7	12	1	1	—	—	1	3	—	1	3	—	38
M V	3	6	—	—	3	1	1	4	—	—	—	1	1	—	1	—	—	21
M VI	2	1	—	—	2	1	1	2	—	—	—	—	—	—	1	—	—	10
M VII	1	5	—	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	—	10
Summe d. sicheren Milzschwellungen	109	63	15	29	50	65	255	139	35	29	12	36	48	28	19	25	25	982
M ±	25	6	6	5	2	—	69	55	17	55	8	8	4	42	6	5	12	325
M 0	36	57	9	5	11	1	51	62	19	145	52	10	1	44	11	2	13	529
Gesamtzahl aller Untersuchten	170	126	30	39	63	66	375	256	71	232	72	54	53	114	36	32	50	1836

Unter 1836 Untersuchten hatten	982 (= 53,5	Proz.)	deutliche Milzvergrößerung
„ „ „ „	529 (= 28,8	„)	keine „
„ „ „ „	325 (= 17,6	„)	den Befund ±,

d. h. eine undeutliche Resistenz in der Milzgegend, deren Natur wegen starker Spannung der Bauchdecken oder sonstiger Untersuchungsschwierigkeiten (Gravidität usw.) nicht sicher auszumachen war. Jedoch muß

angenommen werden, daß es sich bei einer größeren Anzahl von diesen ±-Fällen, und zwar in mindestens der Hälfte, auch um Milzvergrößerungen handelte. Demnach würde sich der Prozentsatz der Milzschwellungen um mindestens 8,8 Proz. auf 62,3 Proz. im ganzen erhöhen. Aber auch bei diesen Prozentzahlen handelt es sich — ebenso wie bei unseren Blutbefunden — um Minimalzahlen für die von uns Untersuchten. Als eigentlicher „Milzindex“ können sie nur für die Schuluntersuchungen gelten, wenn alle Kinder untersucht wurden. Aus den Untersuchungsresultaten bei den Kommissionsterminen und in den Ambulatorien ist nicht ohne weiteres ein Rückschluß auf den Milzindex der Gesamtbevölkerung gestattet, da ja meist nur die Kranken und solche, die sich krank fühlen oder Chinin haben wollten, zu den Untersuchungen kamen. Vermutlich dürfte daher der „Milzindex“ für die Gesamtbevölkerung geringer sein (siehe auch unter „Epidemiologie“).

57 Proz. aller Milzschwellungen zeigten die Größe I, etwa 24.5 Proz. die Größe II und etwas über 10,4 Proz. die Größe III, während die Größen IV—VII zusammen nur 9,1 Proz. der Untersuchten betrafen. Gewisse Gegenden, namentlich die beiden kaum 4 km voneinander entfernt im Narentatal gelegenen Dörfer Vid und Gabela zeichnen sich besonders durch das Vorkommen von großen Milzen aus: in Vid unter 63 positiven Milzbefunden 6 mit Milzgröße V, 1 mit Milzgröße VI und 5 Kranke mit Größe VII; in Gabela unter 50 Positiven: 3 Kranke mit Milzgröße IV, 3 mit V, 2 mit VI und 1 mit VII (siehe Abbildungen 5—7). Auch in einem anderen Malariazentrum im Küsten-Karstgebiet, nämlich in Marina, dem benachbarten Sevid-Račice und in Vinišcé, ferner in der von den Italienern geräumten Okkupationszone (Vrana und Benkovac) sowie in Jadrtovac und Vrpolje bei Šibenik, sind enorme Milztumoren keine Seltenheit. So fanden wir in Marina unter 109 Milzschwellungen je 3 mit IV und V, 2 mit VI und 1 mit VII.

Diese Fälle mit den großen harten Milzen, die sich mitunter tumorartig für das Auge erkennbar durch die Bauchdecken vorwölben (Fig. 16), beanspruchen ein ganz besonderes Interesse. Bei ihrer Erkennung legt man sich unwillkürlich die Frage vor: Handelt es sich hier wirklich noch um reine Malariamilzen, also um den Ausdruck einer chronischen, mit allgemeiner Kachexie einhergehenden Malariaform oder um eine im Anschluß an Malaria entstandene hyperplastische Milzkrankheit sui generis oder schließlich eventuell um eine andere Krankheit (Leishmaniose)?

Nach unserer Ansicht sind die meisten der Milzen mit Größe V—VII wahrscheinlich als eine auf einem durch Malaria vorbereiteten Boden entstandene, mit enormer Hyperplasie des Milzgewebes einhergehende besondere Organerkrankung anzusehen, die ihrerseits wieder durch funktionelle Ausfallserscheinungen zur Kachexie führt. Das könnte man auch daraus schließen, daß die meisten der Fälle mit enormen Milzen keine oder nur wenige Parasiten im peripheren Blut zeigten, allerdings nicht stets: Während z. B. in Vid von den 12 Fällen mit Milz V—VII nur einer ganz vereinzelte Tropicaringe hatte, konnten in Gabela zur Zeit einer heftigen Tropicaepidemie 2 Fälle mit Milz V und VI nachgewiesen werden, die infolge einer offenbar frischen Tropicainfektion ziemlich viele Parasiten, auch zahlreiche Schizonten, hatten; einen ähnlichen Fall mit Milz V und vielen Tropicaringen sahen wir in Opuzen bei einem 50jährigen Manne. — Mühlens fand während des Krieges auch einmal in der Gegend von Jambol (Südbulgarien) bei einer älteren Frau mit Milz VII junge Quartanaparasiten in Schizogonie und dachte damals an frische Quartanainfektion bei einer Malaria-Kachexie mit enormem Milztumor. — Wir glauben auch die Parasitenbefunde bei unseren dal-

matinischen Fällen im selben Sinne deuten zu können. Das spräche dann gegen eine absolute Malaria-Immunität, selbst bei den Kachektischen mit Milztumor, die somit auch als Parasitenträger gefährlich sein können: einer mit Milz V in Gabela und einer mit Milz VI in Marina hatten ziemlich viele Halbmonde.

Die meisten der enorm großen Milzen (V—VII) fanden sich bei Erwachsenen im Alter von 30—56 Jahren (ein Zeichen, daß die Milzkranken trotzdem alt werden können), nur einzelne auch bei Kindern: So sahen wir in Gabela ein 5jähriges Mädchen mit Milz VII (Abb. 7), das im Blute zahlreiche Tropicaringe und auch (weniger) Halbmonde, also eine ziemlich frische Infektion zeigte. — Ein 2jähriger Junge in Vrpolje mit einer fast ebenso großen Milz hatte im Blute viele Quartanaparasiten (Schizonten und noch mehr Gameten).

Leishmaniose hätte man am ehesten bei den Kindern vermuten dürfen, zumal da die Kinder-Leishmaniose ja in einigen Mittelmeerländern (Italien, Griechenland u. a.), sowie unseres Wissens auch in Istrien nachgewiesen ist. Aber unsere wenigen Kinder mit Milz V—VII zeigten sichere Malariainfektionen, und das klinische Bild sprach in keinem unserer Fälle für Leishmaniose.

Letzteres gilt auch von den Erwachsenen. Leider bot sich uns zu Milz- oder Knochenmarkspunktionen keine Gelegenheit. Auch gelang es uns nicht, einen Leishmaniose-verdächtigen Hund aufzutreiben.

Nicht nur die ganz großen Milzen zeigten eine sehr harte Konsistenz, sondern auch viele der weniger großen (III—IV) und selbst oft der kleineren (I—II), namentlich in den älteren und mehr chronischen Erkrankungen, während sie bei den frischen Infektionen in der Regel weicher war. In letzteren Fällen war die Form der Milz meist mehr rund, kugelig, bei den großen harten Milzen entweder eiartig-oval, tumorartig oder mehr länglich-zungenförmig.

In manchen Präparaten fanden wir zwar erhebliche Vermehrungen der leukozytären, auch lymphozytären Blutelemente, aber niemals ein typisches leukämisches Blutbild.

Nicht selten sehen wir die Eosinophilen enorm vermehrt, was auf die Häufigkeit von Darmparasiteninfektionen, namentlich bei Kindern, schließen läßt. — Bekanntlich ist aber auch die **Echinokokken**infektion in manchen Gegenden (z. B. Šibenik, Marina, Metković) nicht selten. Im Hospital in Šibenik sah Mühlens unter Führung von Dr. Boteri allein 7 Fälle in den verschiedensten Stadien. Gelegentlich könnte eine Echinokokkenblase auch die Milz oder Milzgegend betreffen und zu Verwechselungen mit Malariamilzen Anlaß geben.

Zum Schluß sei noch eine merkwürdige Erscheinung erwähnt, die dem einen von uns (Mühlens) auch schon in anderen Malarialändern aufgefallen war, die aber in der Literatur unseres Wissens bisher nicht genügend gewürdigt ist: Unsere meisten Patienten mit den großen Milzen (V—VII) waren weiblichen Geschlechts, wie aus folgender Zusammenstellung ersichtlich ist:

Von	Patienten	mit Milz	waren	männlich,	weiblich
Von	21	V	6		15
„	10	VI	4		6
„	10	VII	1		9
Von	41	V—VII	11		30

Dabei ist noch in Betracht zu ziehen, daß mindestens $^1/_3$ weniger Frauen auf Milzschwellung untersucht waren als Männer. Dementsprechend kann man wohl annehmen, daß in Dalmatien mindestens 3,5—4mal soviel Frauen und Kinder Milzschwellungen von Größe V—VII hatten, als Angehörige männlichen Geschlechts. Wir glauben das nicht als bloßen Zufall bei den Untersuchungen erklären zu können, sondern sind der Ansicht, daß die Frauen weit eher zu den enormen Milzhypertrophien neigen.

IV. Das klinische Bild

der dalmatinischen Malariaerkrankungen war je nach der Art und Schwere der Infektion verschieden. Der Bevölkerung ist die „Tertiana" (auch im Volksmunde so genannt) mit ihren sich ein um den anderen Tag oder täglich wiederholenden Frost- und Fieberanfällen sehr wohl bekannt. Sie wird sozusagen als ein notwendiges Übel (etwa wie Kinderkrankheiten) betrachtet. Unglaublich war manchmal die Gleichgültigkeit gegenüber der Malaria. Die wenigsten Kranken pflegten den Arzt oder gar ein Krankenhaus aufzusuchen, zumal da Chinin, das „tägliche Brot" vieler Dalmatiner, im Handverkauf und sogar im Tauschhandel überall zu haben ist. Auch die Quartana mit Fieberanfällen an jedem 4. Tag war fast allenthalben bekannt. Jedoch erfolgten die Anfälle häufig nicht in dieser typischen Weise, sondern im Duplicata- oder Triplicata-Typ infolge Infektion mit mehreren, sich an verschiedenen Tagen entwickelnden Parasitengenerationen. Vor allem die Quartana verlief oft in lange ohne Fieberanfälle sich hinziehender chronischer Form mit Milzschwellungen (II—IV), wobei dann im dicken Tropfen neben Schizonten häufig viele Gameten nachzuweisen waren. Aber wir sahen auch derartige Tertiana- und Tropicainfektionen. Gerade diese oft unbeachteten und nicht behandelten Parasitenträger mit vielen Gameten (manchmal sahen wir bis zu 15 und mehr Halbmonde in einem Gesichtsfeld des dicken Tropfens) bilden die Hauptursache und größte Gefahr für die Weiterverbreitung der Malaria. Oft erkennt man sie an ihrem blassen, leicht gelblichen Aussehen (auch Skleren subikterisch) und ihrer schlappen Haltung. Manche der chronischen Kranken sehen gar kachektisch aus: Frauen und Männer mit gelben, eingefallenen, runzeligen, lederartigen, fett- und blutlosen Wangen, körperlich stark abgemagert, nur der Leib durch Milz- und Leberschwellung ballonartig aufgetrieben; Kinder oft in entsprechender Weise vorzeitig gealtert und zum Teil greisenhaft verändert und entwicklungsunfähig, nicht selten Kretintypus. Eine Anzahl derartiger Kinder sahen wir namentlich in Marina, Vid, Gabela und Opuzen. Sie pflegen der Malaria zum Opfer zu fallen, ebenso wie manche der älteren Malaria-Kachexien an Malaria und eventuellen Folgekrankheiten zugrunde gehen. Andererseits fiel es uns aber auch auf, daß nicht selten Leute mit großen Milztumoren im Felde arbeiteten und auch große Wege machten; sie schienen an dies „notwendige Übel" gewohnt zu sein. Manche erreichten auch — wie schon erwähnt — ein Alter von 50 Jahren und mehr. Eine Frau in Marina mit einer bis ins Becken herabreichenden Milz hatte kurz vor unserem Besuch ein — allerdings kümmerliches — Kind geboren.

Von anderen klinischen Symptomen erwähnen wir noch die neben der Milzschwellung sehr häufige Lebervergrößerung und -verhärtung. Ascites fanden wir nie, selbst nicht in den kachektischen Fällen; auch schienen Oedeme an den Beinen nicht häufig zu sein. Jedoch sahen manche Kinder, namentlich in Vid, Metković und Gabela, pastös aufgetrieben aus mit dicken Bäuchen, viele mit stumpfsinnigen, abgehärmten, leidenden Gesichtszügen. Sehr häufig beobachteten wir Herpes mit den verschiedensten Lokalisationen (Lippen, Nase, Wange, Stirn, Ohr, einmal auch Herpes corneae), und zum Teil in starker Ausbreitung. Nicht selten wurde, namentlich bei Schulkindern, „Gähnen" als Vorzeichen eines nahenden Anfalls beobachtet (in Trogir ist daher die Malaria vielfach als „Gähnkrankheit" bezeichnet. Dasselbe Symptom ist übrigens auch früher schon von Mühlens in Nordwestdeutschland beschrieben worden.

Hämorrhagien irgendwelcher Art gelangten nicht zu unserer Kenntnis außer einem Fall, in dem es sich wahrscheinlich um durch das Chinin veranlaßte Blutungen handelte. Chininidiosynkrasien schienen überhaupt sehr selten zu sein. Im allgemeinen fanden wir bei unseren zahlreichen Besuchen in den Wohnungen aller Malariagegenden relativ wenig Kranke außerhalb der Anfälle wegen Malaria daniederliegen. Meist stehen die Leute (auch die älteren Kinder) nach dem Anfall bald wieder auf. Jedoch sahen wir auch Fälle mit einer Art von kontinuierlichem Fieber, die zum Teil von den behandelnden Aerzten für typhös gehalten waren, seit 1—3 Wochen zu Bett liegen. Sie wurden durch die Blutuntersuchung als schwere Tropica erkannt. Chininbehandlung brachte meist schnell die Genesung.

Die direkte **Sterblichkeit** an akuten Malariainfektionen scheint im ganzen nur gering zu sein. Nach Schilderung von Kollegen und Bewohnern schlimmer Tropicagegenden (Vid, Gabela. Dugopolje, Marina, Metković und Umgebung) sind aber in den letzten Jahren, namentlich unter Kindern Todesfälle unter typhösen und meningitischen Erscheinungen vorgekommen, bei denen es sich nach unserer Ansicht zum Teil sicher um Malaria tropica, die ja unter derartigen Bildern verlaufen kann, gehandelt hat (so z. B. nach Dr. Pecotić bei 2 Fällen in Metković im Jahre 1921). Auch Erwachsene können an Tropicainfektionen unter Typhus- oder Meningitissymptomen schnell zugrunde gehen. Wir selbst sahen keinen typischen Malariatodesfall während unserer Arbeiten in Dalmatien, da wir in Fällen mit zahlreichen Parasiten für schleunigste (eventuell intramuskuläre) Chininbehandlung sorgten. Nur ein Kranker, von dem das schon erwähnte Blut mit den zahlreichen „Übergangsformen" stammte, soll $^1/_2$ Std. nach der Blutentnahme gestorben sein. Aus diesem sowie auch aus den anderen vorhin erwähnten Möglichkeiten ergibt sich die Lehre, in allen fieberhaften Erkrankungen zunächst Chinin — bei Bewußtlosen intramuskulär — zu geben, ohne das Resultat der Blutuntersuchung abzuwarten.

Aus älteren Zeiten ist bekannt, daß ganze Städte und Dörfer Dalmatiens durch die Malaria dezimiert und entvölkert worden sind.

Offenbar hat das heutzutage übliche Chininnehmen bei allen Fiebern dazu beigetragen, der Malaria einen Teil ihres Schreckens zu nehmen.

Im allgemeinen reagierten alle uns bekannt gewordenen Fälle klinisch zunächst prompt auf die Chininbehandlung mit Tagesdosen von 1,0 g (Kinder entsprechend weniger) per os. Alerdings war — bei der meist fehlenden regelmäßigen Nachbehandlung — die Neigung zu Rezidiven eine große. So war es meist unmöglich, Rückfälle und Neuerkrankungen auseinanderzuhalten, zumal da auch die anamnestischen Angaben der wenig intelligenten Bauernbevölkerung meist unzuverlässig schienen. Wir mußten daher gänzlich darauf verzichten, in unseren Statistiken die Neuerkrankungen und Rezidive zu trennen.

Dr. Boteri (Šibenik) heilte einen Quartanafall mit Methylenblau. Auch wir haben Heilversuche bei Quartana mit Methylenblau veranlaßt.

Ein besonders hartnäckiger Tropica-Fall verdient besondere Erwähnung: Ein Franziskanermönch aus Trogir behielt im Herbst und Winter 1922, angeblich trotz gewissenhaften Chininnehmens (2mal wöchentlich 1 Gramm) dauernd zahlreiche Halbmonde im peripheren Blut; seine Milz war I—II. Zeitweise traten auch Fieberrückfälle auf. Auch im Juni und Juli 1923 fanden wir bei den Blutuntersuchungen

immer noch Tropicagameten. Dieser nach mehr als einer Richtung hin interessante Fall zeigt also u. a., daß auch Tropicagameten trotz Chininbehandlung durch mindestens 3 Jahreszeiten (auch Winter und Frühjahr) hindurch beim selben Patienten im peripheren Blut nachweisbar bleiben können. Da es kaum anzunehmen ist, daß es dauernd die gleichen Halbmonde waren und da auch Neuinfektionen im Winter und Frühjahr in Trogir ausgeschlossen schienen, so muß angenommen werden, daß die Halbmonde sich dauernd aus Schizontenformen in den inneren Organen neu bildeten. Dabei fand ein „Uebergang" in einen anderen Typus nicht statt.

Daß auch Schwarzwasserfieber in Dalmatien vorkommt, konnten wir in Metković feststellen. Am Tage, nachdem wir Herrn Kollegen Pecotić nach dieser Krankheit gefragt und auf ihre Symptome aufmerksam gemacht hatten, wurde Dr. P. zu einem typischen mittelschweren Fall und bald darauf zu einem schwereren Fall gerufen. Wir sahen beide Kranken. Sie wurden nach unseren Ratschlägen in der üblichen Weise behandelt und nach Ablauf des Anfalles einer Chiningewöhnungskur mit langsam steigenden kleinen Dosen unterzogen. Beide genasen und die letztere Patientin, die zur Zeit ihrer ersten Fiebererkrankung im 3. Monat gravide war und nach der ersten Chinindosis angeblich gleich den Schwarzwasseranfall bekam, gebar 6 Monate später ein kräftiges, gesundes Kind. In beiden Fällen war auf Grund einer Malaria tropica die Hämoglobinurie durch eine voraufgegangene Chinineinnahme ausgelöst worden. Der russische Kollege in Metković hatte angeblich auch im Herbst 1922 einen Schwarzwasserfieberanfall behandelt.

Nach unseren Ermittelungen sollen auch früher in Dalmatien mitunter Schwarzwasserfieber beobachtet worden sein, in den letzten Jahren u. a. wiederholt in der Gegend von Vrana und Benkovac (in Norddalmatien).

Von anderen **Komplikationen** der Malaria sei noch die Pneumonie erwähnt, die aber relativ selten sich an Malaria anschließt.

Während die Malaria häufig die Disposition zu Tuberkulose zu schaffen scheint, ist hingegen anscheinend die Disposition zu progressiver Paralyse (trotz Vorkommens von ziemlich viel Syphilis) in dem malariareichen Dalmatien vermindert. Denn Paralyse soll nur relativ selten vorkommen.

V. Untersuchungen über die Anophelesmücken.

Da im Bericht vom Jahre 1921 der für die Bekämpfung so außerordentlich wichtigen Anophelesfrage nur wenig Raum gewidmet war und nur kurz erwähnt wurde, daß bisher nur Anopheles maculipennis gefunden worden sei, so mußten die dalmatinischen Anophelen und ihre Lebensgewohnheiten von uns ganz besonders eingehend studiert werden, um auf diesen Ermittlungen einen Teil des Bekämpfungsplanes aufbauen zu können.

A. Die geflügelten Anophelen.

Als bevorzugte Aufenthaltsorte stellten wir im Herbst 1922 und im Frühjahr 1923 außer den Wohnräumen die folgenden fest: Tierställe, Aborte und zum Teil windgeschützte Verstecke unter im Freien gelegenen steinernen Treppenaufgängen, kellerartige Räume u. a.

Tierställe gibt es in Dalmatien bei fast jedem Haus (selbst in Metković) und auch im Freien; zum Teil liegen sie (z. B. in Vid) direkt offen an der Straße. Wir fanden die Anophelen in Schweine-, Rinder-, Pferde-, aber auch in Ziegen- und Hühnerställen, so z. B. in Hühnerställen außerordentlich zahlreich in und bei Metković im Juli 1923, dick voll Blut gesogen. Die meisten Anophelen

hingen an diesen Orten in dunklen, windgeschützten Ecken, insbesondere auch an Spinnengeweben. Mitunter waren, sie, namentlich im Herbst, auch am Tage recht stechlustig. So wurde einer von uns im hellen Sonnenschein vor einem Stall in Opuzen von 2 Anophelen (von einer in die Unterlippe) gestochen.

Die Menge der Anophelen war im Herbst und Frühjahr wesentlich verschieden. Im Herbst mußten wir in einigen Orten manchmal längere Zeit suchen, bis wir eine Anopheles fanden. Im Oktober allerdings sammelten sich in manchen Häusern größere Mengen (wohl infolge der kühleren Witterung draußen). Im Mai und besonders im Juni und Juli waren die Anophelen — namentlich im Narentatal (Metković, Vid, Opuzen, Gabela) — ganz außerordentlich zahlreich. In einigen Ställen hingen die Ecken und Decken dicht voll mit unzähligen Anophelen. Ja selbst in Wohn- und Schlafräumen fanden wir sie dutzendweise, so z. B. wurden im „Armenhaus" in Metković von unserem Mitarbeiter Dr. Trausmiller in kurzer Zeit 200 Anophelen gefangen und in einem anderen kleinen einräumigen „Malaria-Häuschen" am Narentaufer fingen wir in dem einer fünfköpfigen Familie als Wohn-, Schlaf- und Küchenraum dienenden einzigen Zimmer von etwa 4×4 m Größe über 50 vollgesogene Anophelen. Man kann kaum begreifen, wie die malariainfizierten Einwohner es bei dieser Mückenplage aushalten konnten. Auffallend war, daß gerade die dumpfen, schmutzigen, feuchten, dunklen Wohnungen von den Anophelen bevorzugt werden, weniger allerdings solche Räume, in denen auch auf offenem Feuer gekocht, also Rauch entwickelt wurde. Jedoch fanden wir nicht selten auch in besseren sauberen Zimmern Anophelen (so in Hotels, beim Arzt in Opuzen, beim Pfarrer in Vid u. a.). In Metković fingen wir in unserem Hotel zu allen Jahreszeiten im Schlafzimmer und auf dem Klosett Anophelen.

Interessant ist ferner, daß wir im August auf einer Reise von Metković nach Split auf unserem Passagierdampfer, der die Nacht über in Metković am Kai gelegen hatte, etwa 30 Anophelen in kurzer Zeit auf dem Klosett, im Speiseraum, im Kajütenvorraum und im Mannschaftsschlafraum fangen konnten (vgl. auch S. 363).

In verschiedenen Schulräumen, so in Metković, Vid, Opuzen und namentlich in Gabela sahen wir auch vollgesogene Anophelen an der Decke, in den Klassenzimmern sowie in dunklen Ecken in den Gängen. Offenbar stechen sie dort auch am Tage. Somit können also auch Malariainfektionen in den Schulen übertragen werden. Ebenso in anderen Stätten von Menschenansammlungen, z. B. in Gasthäusern. So fingen wir in einem Gastzimmer in Vid auch sehr viele Anophelen (65 gefangen, $^2/_3$ Weibchen, $^1/_3$ Männchen). Allerdings war draußen neben dem Eingang eine von uns schon im Jahre 1922 ermittelte Lieblingssammelstätte von Anophelen unter einem steinernen, etwas feuchten Treppenaufgang (Abb. 1 und 2). Daselbst konnten wir in beiden Jahren stets sehr viele Anophelen finden, so im Juli 1923 in kurzer Zeit einen ganzen Käfig voll (Abb. 3). Die Anophelen in den kleinen Kästchen auf dem Bilde waren in dem genannten Gastzimmer gefangen.

In Vidonje fanden wir die Anophelen (auch 1 bifurcatus algeriensis-Typ) unter dem Strohdach eines Strohspeichers und in einer als Stall dienenden Felsengrotte.

Nach den Erfahrungen in Palästina hatten wir auch die in allen Dörfern und Städten, zum Teil in den Häusern, zahlreich vorhandenen Zisternen als Anophelen-Aufenthalts- und eventuell Ueberwinterungsplätze vermutet. Wir untersuchten daraufhin ein große Anzahl von Zisternen in Metković, Vid, Opuzen, Mirilović-Sagora, Marina, Drvenik, Vinišće, Dugopolje, Trogir u. a. in den Monaten September/Oktober sowie im Mai und Juli. Auf einem an den 4 Enden befestigten, in die Zisterne hinuntergelassenen Blechdeckel verbrannten wir Schwefelspäne, um die Mücken herauszutreiben. Wir konnten aber auf diese Weise niemals sich in den Zisternen aufhaltende Anophelen nachweisen; nur Culexmücken und Chironomiden kamen zum Vorschein. — Dr. Sfarčić fand auch während des Winters bei wiederholten Untersuchungen in Trogir und Umgebung in den Zisternen niemals Anophelen. (Auf der Insel Krk dagegen sollen nach Mitteilung von Dr. Borčić (Zagreb) Anophelen in Zisternen nachgewiesen sein.)

Nach unseren Beobachtungen zeigten sich die meisten Anophelen in den Monaten Juni und Juli, aber auch im Mai waren sie in manchen Gegenden (Vid, Metković) schon zahlreich. Die im Juni/Juli gefundenen waren meist dick voll Blut gesogen (offenbar teils Tierblut in Ställen und mehr Menschenblut in Wohnungen) und enthielten auch schon Eier. Wesentlich weniger zahlreich ließen sich die Anophelen im September, namentlich in den Wohnungen finden, während sie nach kälteren und Regentagen im Oktober auch dort wieder etwas häufiger vorkamen, aber weniger stechlustig zu sein schienen als in den früheren Monaten. Die Überwinterung der Anophelen erfolgt in Dalmatien offenbar vorwiegend in Ställen, Schuppen und zum Teil auch in Wohnungen, vielleicht auch in Höhlen, anscheinend aber nicht (oder nur selten) in Zisternen.

Das **Verhältnis der Männchen zu den Weibchen** war je nach der Jahreszeit verschieden. Im Mai fanden wir z. B. in Vid unter dem Treppenaufgang sehr viele Anopheles-Männchen, etwa im Verhältnis 2:3, in den Ställen daselbst aber und in den Wohnungen weniger, etwa im Verhältnis 1 Männchen zu 3—4 Weibchen. Auch im Juni und Juli konnten wir noch zahlreiche Männchen nachweisen, aber verhältnismäßig weniger als im Mai, etwa 1 Männchen auf 4—6 Weibchen. Wesentlich geringer war jedoch die Zahl im September und Oktober (Verhältnis etwa 1:10—20 und noch weniger). Dabei ist jedoch zu bedenken, daß wir nicht im Freien, sondern in Unterschlupfen nach Männchen gesucht haben. Bei unseren zahlreichen, aus Eiern und Larven gezüchteten Anophelen war das Verhältnis etwa 1 Männchen auf 2—4 Weibchen.

Die anfangs Mai gefundenen Mücken waren offenbar überwiegend die von den überwinterten Mücken abstammende erste neue Generation. Ende Juni hatten wir bereits die zweite und Ende Juli, spätestens im August, schon die dritte Generation, so daß die im September und Oktober gefundenen Anophelen entweder dieser dritten oder einer weiteren, der vierten Generation, angehörten. Allerdings kommen unserer Ansicht nach 4 Generationen in einer Malariasaison nur für solche Orte in Frage, in denen in den Sommer-Herbstmonaten noch Brutplätze vorhanden sind. In vielen Gegenden und im trockenen Sommer gibt es ja alsdann keine stehenden Gewässer mehr.

B. Die Brutplätze und die Anopheleslarven.

Als Brutstätten ermittelten wir 3 Hauptarten: 1) Wassergräben, 2) Wassertümpel und 3) Lokwas.

Nicht alle Gräben und Tümpel schienen als Anopheles-Brutplätze geeignet. Entsprechend den Erfahrungen in anderen europäischen und subtropischen Gegenden wurden nur solche mit ruhigem, stehen-

dem, nicht verunreinigtem Wasser und einer bestimmten Vegetation von den Anophelen zur Eiablage gewählt. Sie hatten meist ein charakteristisches Aussehen durch ihren Gehalt an Algen, Spirogyren, Ranunculus aquatilis, Potamogeton und Lemnen. Allerdings dürfen letztere nicht so reichlich vorhanden sein, daß sie die ganze Wasseroberfläche zudecken und dadurch den Larven keinen freien Raum zum Luftholen lassen.

In Trogir dienten in den umliegenden Gemüsegärten neben Wassergräben hauptsächlich die zum Bewässern der Gärten bestimmten vegetationsreichen Wasserlöcher mit sauberem Wasser als Brutstätten. In den schmutzigen, jauchigen Wasserlöchern fanden sich dagegen — wie auch anderwärts — nur Culex-Larven. Mitunter sahen wir auch Larven zwischen den breiten Blättern von Wasserrosen, dagegen nie in binsenhaltigen Gewässern und sehr selten in schilfhaltigen Ueberschwemmungs- bzw. größeren Sumpfgebieten, hier — im Schilf — nur vereinzelt im Juli am Rande unmittelbar am Ufer bei Vid, dagegen nicht in der Mitte des Überschwemmungsgebietes.

Besonders charakteristisch konnten wir die Auswahl der Brutstätten durch die Anophelen am Wege zwischen Vid und Metković beobachten: Dort fanden wir in der Nähe einiger Bauernhütten im wasserführenden Graben auf der einen Seite des Weges Anopheleslarven, dagegen in den kilometerweiten Schilfsümpfen (von Flußüberschwemmungen herrührend) auf der anderen Seite des Weges, also kaum mehr als 4—5 m entfernt, bei zahlreichen Untersuchungen zu allen Jahreszeiten niemals auch nur eine einzige Anopheles-Larve. Diese riesengroßen Schilfsumpfgebiete im Narentatal und anderwärts scheinen also als Anophelesentwicklungsstätten nicht wesentlich in Frage zu kommen. Wiederholte Untersuchungen im Frühjahr und Herbst ergaben ferner, daß auch die Narentaufer (Stauwinkel daselbst mit Vegetation) frei von Anopheles-Larven waren, so insbesondere bei Metković und Opuzen. Schließlich fanden wir keine Anopheles-Larven in salzhaltigen Tümpeln und Sümpfen an der Meeresküste, z. B. in dem Sumpfgebiet in der Nähe der Mühle bei Trogir, ebensowenig an der Meeresbucht von Marina, wo sich Quell-Süßwasser mit dem Salzwasser vermischt und wo eine üppige Küstenwasservegetation am Ufer bestand. In der Nähe sahen wir auch keine Larven in einigen vegetationslosen Süßwassertümpeln zwischen Felsgesteinen.

Bekanntlich gelten in manchen Ländern (z. B. in Niederländisch-Indien) gerade die in Salzwasser brütenden Anophelen als gefährliche Malariaüberträger. Das kommt also für Dalmatien nicht in Frage. — Vielmehr sind gerade die kleinsten, manchmal unscheinbaren, versteckten schattigen Gräben und Tümpelchen und Randpartien von größeren Tümpeln die Hauptbrutplätze, und zwar in erster Linie im Frühjahr für die erste Generation, die sich in nächster Nähe der Wohnungen entwickelt. Weiter entfernt pflegt man die Larven zahlreicher erst in der 2. und 3. Generation zu finden. Das ist von besonderer Wichtigkeit für die Bekämpfung (vgl. S. 371).

In zahlreichen, in allen Malariagegenden untersuchten Zisternen, selbst Regenwasser- und Hauszisternen, fanden wir niemals Anopheles-Larven. Bekanntlich brüten und überwintern in manchen Gegenden gerade die An. bifurcatus in Regenwasserzisternen (z. B. in Jerusalem). In Dalmatien scheint das nicht der Fall zu sein.

Herr Direktor Apfelbeck aus Serajewo berichtete uns, daß er überwinternde Bifurcatus-Larven im Dezember 1922 unter einer dünnen Eisdecke im Graben bei den vorhin erwähnten Häusern am Wege Vid-Metković fand, wo wir im Oktober 1922 ziemlich viele Anophelen vom Bifurcatus-Typ in den

Ställen festgestellt hatten. (Diese Befunde waren aber Herrn Apfelbeck zur Zeit seiner Untersuchungen noch nicht bekannt.)

Wir selbst haben bisher im Mai/Juli und September/Oktober nirgends Bifurcatus-Larven nachweisen können. — Es sind daher noch weitere Nachforschungen nach solchen zu allen Jahreszeiten notwendig.

Gebirgs-, sog. Schluchtbäche, in denen man eventuell Superpictus-Larven hätte vermuten können, vermochten wir nirgends zu untersuchen, da sie zur Zeit unseres Besuches im Herbst kein Wasser führten. Auch in dieser Richtung sind noch weitere Ermittelungen, namentlich in Gebirgsgegenden, zu anderen Jahreszeiten erforderlich. — Herr Direktor Apfelbeck hat Ende Oktober 1922 in Sutorina (Bucht von Catarro-Montenegro) Superpictus-Larven gefunden. Auch sonst ist ja An. superpictus in Südeuropa nicht selten und gilt in manchen Ländern (z. B. Mazedonien, Griechenland und Italien) als gefährlicher Malariaüberträger. Sicher wird er also bei genauerem systematischen Nachsuchen auch noch in Dalmatien zu finden sein.

Die wichtigsten Brutplätze sind in den trockenen Karst- und Hochplateaugebieten die sogen. Lokwas, die daselbst die einzigen offenen Wasserstellen zum Tränken des Viehes bilden (vielfach trinken auch die Menschen dies Wasser). Diese Lokwas dienen gleichzeitig auch als Anophelesbrutplätze, so z. B. in Marina, Sevid-Račice, Vinišće, Dugopolje, Bristewiza und wahrscheinlich auch in Lučane, Vrpolje u. a. Sie enthalten häufig ziemlich sauberes Wasser, wobei die Reinigung vielleicht zum Teil durch die Vegetation erfolgt. Die Larven finden sich meist zwischen oder in der Nähe der Vegetation. Häufig sahen wir trotz Vorhandenseins von vielen kleinen Fischen, Kaulquappen und selbst von den als Larvenfeinde geltenden Notonecten zahlreiche Larven in den Lokwas zwischen der Vegetation versteckt. Interessant waren besonders die Lokwas in Marina und Drvenik, woselbst nur 3 bzw. 2 solcher Wasseransammlungen als Anopheles-Brutplätze in Frage kamen: In Marina waren 2 Lokwas (Abb. 8) etwa 800 m Luftlinie von dem Dorf entfernt, eine weitere größere sogar 14—1500 m. Im Herbst und auch im Mai fanden wir nur in der dem Dorfe zunächst gelegenen Lokwa Larven, und zwar schon anfangs Mai vollentwickelte Larven und auch einige Puppen, aus denen in unserem Laboratorium in Trogir in wenigen Tagen geflügelte Anophelen ausschlüpften. Ende Juli waren auch in der weiter entfernten größeren Lokwa zahlreiche Larven.

In Drvenik lagen die beiden Lokwas mitten zwischen den Häusern: die eine enthielt nur im August 1922 Larven, im September war sie von Lemnen völlig überwuchert; die zweite Lokwa hatte auch im September noch Larven, dagegen im Mai keine. Im September 1922 war sie von uns petrolisiert worden.

In Vinišće fanden wir in einer tief in einer Felsengrube ganz versteckt gelegenen kleinen vegetationsreichen Lokwa viele Anopheles-Larven, nachdem Herr Direktor Apfelbeck kurz vorher in 2 anderen Lokwas vergebens nach Anopheles-Larven gesucht hatte. — In Bliesna und Bristewiza u. a. sahen wir im Mai auch noch keine Larven in den dortigen großen, ziemlich weit von den Wohnhäusern entfernt gelegenen Lokwas, während Dr. Sfarčić im August 1922 daselbst zahlreiche nachgewiesen hatte.

Die Mengen der Larven waren an den verschiedenen Brutplätzen je nach der Jahreszeit schwankend. Die meisten fanden sich — entsprechend der Zahl der geflügelten Insekten — im Frühjahr und Frühsommer; im September auch noch stellenweise ziemlich viele; im Oktober aber nur noch vereinzelte.

C. Die dalmatinischen Anophelesarten.

Im September und Oktober 1922 fanden wir zunächst nur Anophelen vom Maculipennis-Typ. Da aber viele derselben, namentlich unter den Ende September in Opuzen gefangenen, uns keine typischen Exemplare zu sein schienen, so sandten wir sie zur genaueren

Bestimmung an den Entomologen des Hamburger Tropeninstituts, Herrn Prof. Martini. Mitte Oktober fingen wir auch in Ställen am Wege nach Vid sowie in Vid selbst, ferner später vereinzelt in Metković und in Vidonje, etwa zwei Dutzend Anophelen vom Bifurcatus-Typ, die meisten in und bei Vid, Auch diese wurden mit anderen Mücken vom Maculipennis-Typ ebenfalls nach Hamburg gesandt. Ebenso einige Culex-Arten, darunter auch in Split und Metković gefangene Stegomyien[1]). Nachfolgend die Untersuchungsresultate:

Bericht des Prof. Martini (Hamburg) über die Bestimmung der ihm übersandten Mücken.

I. Im Herbst 1922.

Gefangen in	An maculipennis		A. elutus		An. algeriensis	
	Männchen	Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen	Weibchen
a) Benkovać, 31. Aug.	—	15	—	—	—	—
b) Opuzen, Ende Aug.	1	1	—	13	—	—
c) Drwenik, Ende Aug.	1	2	—	—	—	—
d) Ställe Opuzen, Ende Sept.	—	„ganz wenige“	—	„zahlreich“	—	—
e) Ställe Opuzen, 14. Okt.	—	„wenige“	—	„zahlreich“	—	—
f) Metković, 15. Okt. (Hotelzimmer)	—	4	—	—	—	—
g) Vid, Ställe und unter der Treppe, Mitte Okt.	—	1		„viele“	—	10
h) Stall Metković	—	—		„viele“	—	1
i) Stall Vidonje, Ende Okt.	—	—		„reichlich“	—	1
k) Vid, Ende Okt.	—	1		„reichlich“	—	1
l) Metković, Ende Okt.	—	1		„viele“	—	—

Außerdem fanden sich unter den übersandten Mücken noch von interessanten Arten: mehrere Aëdes dorsalis aus Opuzen, mehrere Theobaldia spathipalpis aus Vidonje, und einige Stegomyia fasciata aus Opuzen, Split und Metković.

An. maculipennis, elutus und algeriensis bilden also nach dem bisherigen Material den Hauptbestand an Anophelen in Dalmatien. Dabei scheinen letztere Arten im Herbst relativ häufiger zu werden, doch kann das bei dem relativ kleinen Material auch nur zufällig so scheinen.

Es kommen in Jugoslavien 5 wichtigere Anophelen in größerer Zahl vor: An. maculipennis, elutus, algeriensis, bifurcatus, superpictus; außerdem ist nigripes (der Baumhöhlen-Anopheles) von mir 1918 im Gebiet des Dobropolje (Mazedonien) gefunden und sinensis einmal von Konsuloff am südlichen Wardar. An. nigripes ist wohl sicher für die Malariaepidemiologie bedeutungslos, vielleicht trifft das für Bifurcatus in Mazedonien und Dalmatien auch zu. Über das Vorkommen von Anophelen der Superpictus-Gruppe im Westen des Landes sind noch Untersuchungen nötig.

---

1) Auch in Trogir kommen vereinzelte Stegomyien vor, ferner reichlich auf der Insel Brazza (Dr. Sfarčić).

An. superpictus ist im Wardargebiet von Skoplje abwärts häufig, reicht auch noch etwas über Skoplje nach Norden, im adriatischen Gebiet ist er bisher nicht gefunden, dürfte aber auch dort nicht fehlen[1]). Von An. bifurcatus liegen aus dem Adriagebiet auch noch keine Stücke vor, er wird dort aber auch vorkommen, vornehmlich wohl in höheren Lagen wie in Mazedonien.

Von den anderen Mücken ist in Jugoslavien Culex pipiens im Herbst überall häufig, hier und da auch lästig. Theobaldia spathipalpis (auch longiareolata genannt) ist eine von Südeuropa bis zum Kap verbreitete Art, über die bisher Nachteiliges nicht bekannt geworden ist. Aedes (Stegomyia) fasciata, der bekannte Gelbfiebermoskito, müßte auf Verbreitung und Häufigkeit besonders im Hochsommer näher untersucht werden.

Über die jugoslavischen Anophelen gebe ich hier einen Schlüssel zur Unterscheidung:

1) Flügel mit dunklen und hellen Schuppen 2
„ nur mit dunklen Schuppen 3
2) nur 3 helle Schuppenflecke am Vorderrand des Flügels, größere Art . . sinensis
ungefähr 6 helle Flecken dort, kleinere Art . . . . superpictus
3) die dunklen Schuppen bilden durch dichtere Stellung Flecken 4
die Schuppen bilden keine Flecken an den Quer- und Gabeladern 5
4) Brustkorb auf dem Mittelrücken mit deutlichem, hellgrauem Längsstrich. Flügelflecken kräftig, auf dem Basallappen des männlichen Hypopygiums steht zwischen Vorderdorn und Gipfeldorn kein weiterer Dorn . . . . . An. maculipennis
Brustkorb auf dem Mittelrücken ohne deutlichen helleren Längsstreifen, Flügelflecken oft recht undeutlich. Bei Männchen steht auf dem Basallappen zwischen Gipfeldorn und Vorderdorn noch ein weiterer Dorn . . . . An. elutus[2])
5) Brustkorb mit sehr deutlichem, hellem Längsstreifen 6
Brustkorb ohne solchen . . . . algeriensis
6) Endglied des weiblichen Tasters mehr als $^1/_2$mal so lang wie das vorletzte. Basalstück des Männchens mit 2 Dornen . . . . An. nigripes
Endglied des weiblichen Tasters deutlich weniger als halb so lang wie das vorletzte Basalstück des Männchens; mit 3 Dornen, von denen 2 gefiedert . . . . An. bifurcatus

Die Hauptunterscheidungsmerkmale zwischen An. maculipennis und An. elutus sind: An. elutus ist meist etwas kleiner und heller als die maculipennis zu gleicher Jahreszeit und am gleichen Orte. Die 4 dunklen Schuppenflecken sind nur schwach ausgebildet. Ein heller Fransenfleck, der sich bei gut erhaltener maculipennis meist an der Flügelseite findet, fehlt bei elutus. Ferner hat maculipennis auf dem Rücken des Brustkorbes einen breiten hellgrauen Längsstreifen.

An. bifurcatus und An. algeriensis unterscheiden sich folgendermaßen: Bei bifurcatus ist derselbe helle Längsstreifen auf dem Brustkorb vorhanden, wie eben für maculipennis erwähnt; bei algeriensis ist der Brustkorb ziemlich gleichmäßig dunkel. Durchschnittlich ist algeriensis kleiner.

Von den wichtigeren Anophelen ist dringend die Sammlung reichen Materials über lokale Verbreitung und Häufigkeit erforderlich sowie die Sammlung biologischer Daten. Das setzt wieder Kenntnis der Larven voraus. Diese sind aber nach der bisherigen Literatur keineswegs ausreichend zu unterscheiden; von An. elutus und maculipennis lassen sich nach Edwards die Larven nicht unterscheiden, doch ist es nicht unwahrscheinlich, daß weitere Untersuchungen Unterschiede aufdecken. Dazu ist der gerade Weg die Züchtung in Einzelhaft; doch kann auch Sammeln reichen Larvenmaterials, Konservierung in warmem Alkohol und Einsendung der gut verpackten Larven die Sache fördern.

Die heutige biologische Malariabekämpfung versucht Speziessanierung, d. h. sie wendet sich gegen die gefährlichste Art. Welche das ist, ist bei den europäischen Mücken noch schwer zu sagen. In Mazedonien war es

1) Von Apfelbeck in Sutorina gefunden. Vgl. S. 352.
2) Es ist das die von mir im Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 86. S. 252. Fig. 2a als Variante von An. maculipennis hypopygium gegebene Abbildung.

superpictus. Von den anderen Arten sind unsere Kenntnisse sowohl rücksichtlich der Frage der Empfänglichkeit für Malaria, als der der Lebensweise für Südeuropa ganz unzureichend, da das Auftreten von algeriensis und elutus in dieser Fauna erst vor kurzem bekannt geworden ist. Sie sind offenbar vorher mit An. bifurcatus und maculipennis zusammengeworfen worden, und es läßt sich daher nicht entscheiden, wie die bisherigen Beobachtungen auf die 4 Arten zu beziehen sind. Es sind also rücksichtlich der Anophelenkunde die Grundlagen der biologischen Malariabekämpfung für Südeuropa großenteils wieder neu zu beschaffen.

Aus diesem Bericht Prof. Martinis ist also zu ersehen, daß die Haupt-Anophelesarten in Dalmatien: An. elutus, An. maculipennis und An. algeriensis sind. An. elutus steht der An. maculipennis, und An. algeriensis der An. bifurcatus sehr nahe. Nur die Kenner vermögen sie zu unterscheiden. Typische An. bifurcatus konnten bisher in Dalmatien nicht ermittelt werden, ebensowenig trotz eifrigen Suchens unsererseits An. superpictus oder pseudopictus. Superpictus ist dagegen von Direktor Apfelbeck in Sutorina (Bucht von Catarro, Montenegro) festgestellt und wird sich wohl auch in Dalmatien im Hochsommer noch in Gebirgsgegenden finden lassen. — An. algeriensis fanden wir bisher nur im Narentatal und nur in den Herbstmonaten; im Mai und Juli trotz intensiven Suchens dagegen unter vielen tausend gefangenen und untersuchten Mücken nicht; alle waren An. maculipennis und elutus.

Von besonderem Interesse schien es uns nun noch festzustellen, ob sich auch Unterschiede in der Lebensweise der einzelnen Arten nachweisen ließen, insbesondere ob und welche Arten event. mehr in menschlichen Wohnungen vorkämen und welche wohl am ehesten eine Ueberträgerrolle spielen. Wir sammelten daher im Mai sowie Juni und Juli wieder an verschiedenen Plätzen Anophelen.

Ihre genaue Bestimmung durch **Prof. Martini** ergab folgendes:

II. Im Frühjahr und Sommer 1923.

Gefangen in	An. maculipennis		An. elutus	
	Männchen	Weibchen	Männchen	Weibchen
a) Ställen Opuzen 18. 5.	18	16	—	—
b) „ Metković 1. 7.	6	42	—	9
c) „ Vid 3. 7.	29	161	4	19
d) Gasthaus Vid 3. 7.	3	8	1	1
e) Unter der Treppe Gasthaus Vid 3. 7.	49	75	5	33
Summe	105	302	10	62
	407		72	
f) Gezüchtet aus Larven Vinišće Juli 1923	8	10	—	3
g) Gezüchtet aus Larven Gustierna, Juli 1923	2	4	—	—
h) Wohnungen Vrana, Sept. 1923	—	1	—	—
i) „ Benkovać Sept. 1923	—	11	—	—
Gesamtsumme	115	328	10	65
	473		75	

Außerdem waren aus Vid, Vrana und Drniš im Juli und September Larven vom Maculipennis-Typ übersandt. Im Gegen-

satz zum Bifurcatus-Typ lassen sich die Larven von An. maculipennis und elutus noch nicht unterscheiden.

Ein Vergleich zwischen den Anopheles-Arten im Herbst 1922 und Frühjahr und Sommer 1923 ergibt zunächst die Tatsache, daß An. algeriensis bisher nur im Spätherbst (Oktober 1922) nachgewiesen werden konnte, daß ferner die Anopheles elutus im Herbst im Vergleich zu den An. maculipennis wesentlich zahlreicher waren, während An. elutus im Mai z. B. in Opuzen — wo sie im Herbst fast die alleinige Art bildete — überhaupt nicht gefunden wurde, allerdings unter nur 34 genau bestimmten Mücken. — Diese Zahl ist natürlich zu gering und nicht unbedingt beweisend. Jedoch hatten wir stets wesentlich mehr Mücken gefangen und nur eine nicht besonders ausgewählte Anzahl zur genaueren Bestimmung aufgehoben.

Die Frage, ob und welche Art hauptsächlich für die Uebertragung der Malaria in Dalmatien verantwortlich zu machen ist, kann nur durch zahlreiche Mückenuntersuchungen aus Häusern und Ställen sowie durch künstliche Infektionsversuche mit den drei Parasitenarten gelöst werden.

Immerhin haben wir nach unseren bisherigen Ermittlungen über das Mückenvorkommen den Eindruck, daß am ehesten die An. maculipennis in Frage kommt, zumal da gerade sie am häufigsten in den menschlichen Wohnungen gefangen wurde, während An. elutus und An. algeriensis meist aus Ställen stammten.

Als maßgebend kann jedoch nur der „Mücken-Infektionsindex“ gelten.

D. Der Mückeninfektionsindex.

Die Bestimmung des „Mückenindex“ gehört zu den schwierigsten und zeitraubendsten Arbeiten, solange man nicht geübtes Personal zur Hand hat und alle Präparationen von Mückenmägen und Speicheldrüsen selber ausführen muß. Deshalb waren wir gezwungen, die diesbezüglichen Arbeiten zunächst sehr einzuschränken. Erst im Juli 1923 konnten wir 2 Helferinnen im Mückenpräparieren ausbilden. Auch leistete uns Kollege Trausmiller einige Wochen lang wertvolle Hife..

Wir verfügen bisher nur über einen einzigen künstlichen Infektionsversuch: Am 22. und 23. 9. 1922 ließen wir 4 aus Drvenik-Larven selbst gezüchtete Anophelen vom Maculipennis-Typ an einem Tropicakranken in Metković mit vielen Halbmonden, der schon Chinin genommen hatte, saugen. Trotzdem die Anophelen zum ersten Male Blutnahrung erhielten, waren sie schon sehr blutgierig und sogen sich fast bis zum Platzen voll. Von den nach 8—12 Tagen untersuchten vier Anophelen stellten wir bei einer am 10. Tage getöteten ziemlich viele Cysten am Magen fest, darunter eine mit beginnender Sichelkeimbildung; die anderen 3 Mücken waren negativ. Demnach schien die Empfänglichkeit nicht sehr groß. Jedoch ist zu bedenken, daß unsere Infektionsbedingungen sehr ungünstig waren: nur einmaliges Saugen junger Mücken, die von Trogir nach Metković gebracht waren, dann Rücktransport von Metković nach Trogir und dadurch bedingte Temperaturschwankungen, ungünstige Ernährung (Honigwasser) u. a. m. Einer Versuchsanordnung, wie sie z. B. Schüffner in Sumatra machte (mehrmaliges Saugenlassen an aufeinanderfolgenden Tagen) stehen in Dalmatien, wie schon angedeutet.

die größten Schwierigkeiten von seiten der indolenten und doch so mißtrauischen Bevölkerung entgegen, die schon die Erlaubnis zur Entnahme von Blutpräparaten als eine Gunst betrachtet und dafür Chinin als Entgelt verlangt. Deshalb mußten wir auch von den beabsichtigten weiteren Infektionsversuchen Abstand nehmen. Systematische Infektionsversuche wären überhaupt nur in einem gut geleiteten Krankenhause mit zahlreichen Malariakranken in einer möglichst anophelesfreien Gegend (etwa in Šibenik oder Split) möglich. Es dürfte aber außerordentlich schwer fallen, in Dalmatien Kranke dazu zu bewegen, wegen Malaria ins Krankenhaus zu gehen.

Die Untersuchung einer Anzahl von in Häusern und Ställen im Oktober und Juli gefangenen Anophelen vom Maculipennis-Typ ergab auch meist negative Resultate. Sie seien im folgenden kurz zusammengestellt:

1) 19. 9. 22: 12 Mägen und 5 Speicheldrüsen von An. maculipennis aus Ställen Metković: negativ,
2) 6. 10. 22: 3 Mägen und 15 Speicheldrüsen von An. aus Häusern Metković: negativ,
3) 20. 10. 22: Unter 16 Mägen und 15 Speicheldrüsen (5mal alle 6 Lappen) von An. aus Häusern in Opuzen nur 1 Magen mit vier Cysten positiv,
4) 20. 10. 22: Unter 6 Anophelen aus Ställen Opuzen keine positive,
5) 21. 10. 22: Unter 17 Anophelen aus der stark infizierten Häuserreihe am Flußufer Metković nur 1 Magen mit einigen Cysten positiv,
6) 12./13. 7. 23: 66 Anophelen (Mägen und Speicheldrüsen, letztere mitunter nicht vollständig) aus dem Armen- und einem anderen Malariahaus am Narentaufer, Metković: darunter nur 1 Magen mit einigen, etwa 7—8 Tage alten Cysten, also positiv,
7) 14. 7. 23: 32 Mägen und 21 Speicheldrüsen aus Ställen in Metković, sämtlich negativ,
8) 15. 7. 23: 6 Mägen und 4 Speicheldrüsen aus Gastzimmer in Vid: negativ,
9) 16. 7. 23: 12 Mägen und 10 Speicheldrüsen aus Ställen in Vid: negativ,
10) 16. 7. 23: 6 Mägen und 3 Speicheldrüsen aus Ställen in Gabela: negativ.

Wir haben also bei unseren jedesmaligen kurzen Besuchen im Narentatal nur relativ wenige Anophelen untersuchen können:

Im September und Oktober 1922	waren von	20	Anoph. aus	Häusern Metković	1	positiv
„ „ „ „ „	„ „	16	„ „	„ Opuzen	1	„
„ „ „ „ „	„ „	12	„ „	Ställen Metković	0	„
„ „ „ „ „	„ „	6	„ „	„ Opuzen	0	„
„ Juli 1923	„ „	66	„ „	Häusern Metković	1	„
„ „ „	„ „	6	„ „	Gastzimmer Vid	0	„
„ „ „	„ „	32	„ „	Ställen Metković	0	„
„ „ „	„ „	6	„ „	„ Gabela	0	„
„ „ „	„ „	12	„ „	„ Vid	0	„

Im ganzen waren also von 54 im September/Oktober 1922 untersuchten Anophelen nur 2 positiv, und zwar unter den 36 in Häusern gefundenen (also 5,6 Proz.), und im Juli 1923 unter 122 Anophelen nur 1 infiziert, und zwar von den untersuchten 72 Hausanophelen (1,4 Proz.). Unter den 50 Stallanophelen fanden wir keine infizierte.

Aus diesen zu kleinen Zahlen kann man aber noch keine Rückschlüsse auf den allgemeinen natürlichen „Mückeninfektionsindex" machen.

Am sichersten ließe sich experimentell die Empfänglichkeit der einzelnen Anophelesarten zu den verschiedenen Jahreszeiten durch künstliche Infektionen nach dem klassischen Muster von Schüffner auf Sumatra lösen. Dem stellen sich

aber die schon genannten Schwierigkeiten entgegen, mit deren Ueberwindung vorläufig kaum zu rechnen sein dürfte.

So bliebe denn als einziger Weg die Magen- und Speicheldrüsenuntersuchung von vielen Tausenden in Ställen und Wohnungen gefangenen Anophelen übrig, wobei genau darauf zu achten wäre, welche Anophelesart am häufigsten infiziert ist und zu welcher Jahreszeit und ob die infizierten Mücken vorwiegend aus Ställen oder Wohnungen stammen.

Derartige Untersuchungen bilden eine der dringendsten wissenschaftlichen Aufgaben für die kommende Saison.

VI. Die Epidemiologie

der dalmatinischen Malaria ergibt sich zum Teil aus dem bisher über Parasiten und Anophelen Gesagten in Verbindung mit den geologischen sowie den jahreszeitlichen, klimatischen, Regen- und sonstigen Wasserverhältnissen des Landes. In gewissem Sinne ist auch noch mitbestimmend für die Malariaausbreitung die soziale Lage in den Malariagegenden, die daher im nächsten Abschnitt noch besonders besprochen wird.

A. Parasitenindex.

Wie schon auf S. 330 angedeutet, war die Untersuchung der ganzen Bevölkerung nirgends möglich, da sich viele weigerten und andere am Tage im Felde oder sonst unterwegs waren. Demnach läßt sich aus unseren Parasitenbefunden der eigentliche „Parasitenindex“ der Gesamtbevölkerung nicht herauslesen. Nur in Marina konnten an mehreren Tagen etwa $^2/_3$ der Gesamtbevölkerung erfaßt werden. Von 175 daselbst im Herbst 1922 Untersuchten hatten 83 (= 30,2 Proz.) Parasiten bei einmaliger Untersuchung. Zieht man in Betracht, daß durch einmalige Durchuntersuchung im allgemeinen wohl nur etwa $^3/_4$—$^4/_5$ aller Parasitenträger erfaßt werden, so müßte man für Marina im September/Oktober 1922 einen Parasitenindex von mindestens 36 bis 40 Proz. annehmen.

In der schon früher erwähnten Häuserreihe am Narentaufer in Metković wurde etwa die Hälfte der dortigen Einwohner erfaßt. Unter 35 daselbst im Oktober 1922 Untersuchten hatten 14 (= 40 Proz.), mit Irrtumskoeffizienten also etwa mindestens die Hälfte der Einwohner bei einmaliger Untersuchung Parasiten, darunter 13 von 14 Positiven Tropica. In einem Haus waren von 10 Einwohnern 9 malariainfiziert, der 10. Einwohner hatte auch eine Milzschwellung. Derartige „Tropica-Malariahäuser“ mit bis 100 Proz.-Infektionen sehen wir nicht so ganz selten, so auch in Marina, Drvenik und Dugopolje. Es kam aber vor, daß die Häuser unmittelbar daneben völlig malariafrei waren, eine Tatsache, die für die Häuslichkeit der Anophelen zu sprechen scheint. — Unter den sämtlichen von uns untersuchten 12 Beamten der Finanzkaserne Metković hatten 4 ($33^1/_3$ Proz.) Parasiten, und noch 2 weitere eine Milzschwellung, also ein Beweis für die Infektionsgefahren am Narentaufer in Metković, wo diese Beamten — auch nachts — Dienst taten.

Einen guten Anhalt für die Durchseuchung eines Ortes bietet besonders die Untersuchung der Schulkinder. In ihren Blutbefunden spiegelt sich nicht nur das Verhältnis der Parasitenarten zueinander, sondern auch die Infektionsintensität des Ortes wieder. Allerdings kommt hier zu dem allgemeinen Irrtumskoeffizienten noch die Zahl der — meist wegen Malaria — fehlenden Schüler hinzu. Immerhin

halten wir da, wo Schulen sind, die Kinderdurchuntersuchung für die beste und schnellste Orientierungsart über den Parasitenindex. Das Resultat unserer derartigen Erhebungen paßte auch meist gut in das sich aus den übrigen Untersuchungen ergebende Gesamtbild hinein.

In der Schule in Metković fanden wir unter 232 am 13. 10. 1922 Untersuchten 32 Kinder (= 13,8 Proz.) mit positivem Blutbefund; mit beiden Irrtumskoeffizienten also mindestens 20—25 Proz. Blutinfektionen.

Im Gymnasium Metković hatten am 22. 9. von 63 Untersuchten 13 (= 20,6 Proz.) Parasiten, mit Koeffizienten etwa 30—35 Proz. — Von diesen Infizierten waren allerdings bis auf 2, die an der Peripherie von Metković wohnten, alle von auswärts.

In der Schule in Vid waren am 14. 10. 1922 von 30 untersuchten Kindern 13 blutpositiv (= 43,3 Proz.), mit Koeffizienten mindestens 60 Proz.).

In der Schule Drniš untersuchten wir am 25. 10. 1922 nur 121 durch Aussehen, Anamnese und event. Milzbefund verdächtige Kinder (etwa $^2/_5$ sämtlicher Kinder). Von diesen waren nur 16 positiv, also ein relativ sehr geringer Index, zumal wenn man bedenkt, daß nur von den Verdächtigen Blut untersucht wurde. Die Positiven gehörten zum Teil den benachbarten Dörfern an.

In der Schule in Trogir, wo wir auch nur von den „Verdächtigen" Blut entnahmen, fanden wir am 23. 10. 1922 nur bei 3 von 203 untersuchten Kindern Parasiten, und in Capelle-Stafilić am 16. 10. 1922 unter 80 Untersuchten auch nur 3 Parasitenträger. Das stimmte damals mit der geringen Durchseuchung der übrigen Bevölkerung daselbst sehr gut überein.

Im allgemeinen glaubten wir auf Grund unserer Blutuntersuchungen den Parasitenindex in den am stärksten infizierten Malariagegenden Dalmatiens, vor allem im Narentatal im September/Oktober 1922 auf mindestens 30—60 Proz., je nach Gegend, annehmen zu können. Am intensivsten infiziert schienen: Vid, Gabela, Novo-Selo, Marina, Dugopolje, Drvenik, Lučane, Opuzen, Metković und Umgegend.

Ueber das Verhältnis der einzelnen Malariaarten zueinander ist schon früher berichtet worden.

Zum Schluß sei hier nochmals betont, daß man ein genaues Parasitenbild in einer Malariagegend nur dann gewinnen kann, wenn man nicht nur die sich Meldenden, sondern die ganze Einwohnerschaft untersucht. Viele persönlichen Erfahrungen lehren uns, daß man alsdann häufig eine ungeahnte Malariaausbreitung feststellen kann. — So ging ja auch am Panamakanal die Malariazahl gewaltig in die Höhe, als man nicht mehr nur die freiwillig sich Meldenden untersuchte. In Italien erzählte uns ferner im Juni 1923 Grassi, daß er in seinem Malariabezirk Fiumicino die höchsten Malariazahlen trotz intensiver Bekämpfung hätte, einfach, weil er in regelmäßigen Abständen die ganze Bevölkerung untersuchte und die Parasitenträger wirklich feststellte.

B. Milzindex.

Zu dem Parasitenindex paßte so ziemlich in gewissem Sinne auch das Resultat der Milzuntersuchungen, allerdings mit der Einschränkung bzw. Erweiterung, daß im allgemeinen die Zahlen der positiven Milzbefunde höher waren als die der Parasitenbefunde. Das stimmt mit den Erfahrungen in anderen Malarialändern überein. Auch fanden wir, daß nicht nur häufig Leute mit Milzschwellungen keine Parasiten hatten, sondern wir sahen auch oft mehr oder minder stark mit Parasiten Infizierte, selbst Tropicafälle, ohne Milzvergrößerung. Zur Illustration einige Beispiele:

—

Tabelle VII.

Vergleich der Milz- und Parasitenbefunde im Herbst 1922.

	Untersucht	1) Parasiten +	2) Milz +	3) Milz + Parasiten 0	4) Parasiten + Milz 0	5) Summe 1 + 3
1) Marina	178	74 (41,6%)	123 (69,3%)	58 (32,6%)	12 (6,7%)	132 (74,5%)
2) Amb. Vid	140	35 (25,0 „)	68 (48,6 „)	44 (31,4 „)	15 (10,7 „)	79 (56,4 „)
3) Schule Vid	30	13 (43,3 „)	18 (60,0 „)	8 (26,6 „)	4 (13,3 „)	21 (70,0 „)
4) Gabela	66	44 (66,0 „)	54 (81,8 „)	14 (21,2 „)	5 (7,6 „)	58 (87,9 „)
5) Schule Metkovič	232	32 (13,8 „)	58 (25,0 „)	42 (18,1 „)	15 (6,4 „)	74 (32,3 „)
6) Opuzen I 26. 9.	120	40 (33,3 „)	85 (70,8 „)	54 (45,0 „)	10 (8,3 „)	94 (78,3 „)
7) Opuzen II 15.10.	259	73 (28,2 „)	209 (80,7 „)	139 (53,7 „)	7 (2,7 „)	212 (81,5 „)
8) Dugopolje	51	34 (66,6 „)	32 (62,7 „)	7 (13,7 „)	8 (15,7 „)	41 (80,4 „)
9) Drvenik	70	35 (50,0 „)	41 (58,6 „)	17 (24,3 „)	10 (14,3 „)	54 (77,1 „)
Summe	1146	380 (33,1%)	688 (60,0%)	383 (33,4%)	86 (7,5 %)	765 (66,7%)

In dieser Uebersicht sind nur die Fälle aufgeführt, in denen gleichzeitig und einheitlich Parasiten- und Milzbefunde erhoben worden waren. Dabei ist die Hälfte der ±-Milzbefunde (entsprechend unseren Darlegungen auf S. 340) als positiv zu den absolut sicheren Milzschwellungen (I—VII) hinzugezählt, die andere Hälfte dagegen zu den negativen Befunden gerechnet. Auf diese Weise glaubten wir annähernd richtige Zahlen garantieren zu können.

Aus unserer Zusammenstellung ergibt sich, daß — außer in Dugopolje[1]) — stets der Prozentsatz der positiven Milzbefunde höher war als der der Parasitenbefunde: In der Ambulanz des alten Malarianestes Vid wurden fast doppelt so viel Milzschwellungen als Parasitenbefunde festgestellt, und in dem lange und stark verseuchten Opuzen am 15. Okt. sogar fast 3mal mehr positive Milzbefunde. Die Gesamtzahl der Milzschwellungen ohne Parasitenbefunde (383) betrug über 55 Proz. aller positiven Milzbefunde (688), die Gesamtzahl der Parasitenbefunde ohne gleichzeitige Milzvergrößerung 86 (= 22,3 Proz.) unter 380 Parasitenbefunden im ganzen. Demnach hatten nur 294 (= 75,4 Proz.) Infizierte gleichzeitig positiven Parasiten- und Milzbefund. — Rechnet man die Zahlen der Parasitenbefunde mit den Milzbefunden ohne Parasiten zusammen, so erhält man eine noch höhere Indexzahl, als sie selbst die positiven Milzbefunde allein anzeigen, nämlich 765 (66,7 Proz.) gegenüber 688 (60 Proz.) und sogar mehr als das Doppelte der alleinigen Parasitenbefunde. Hieraus folgt, daß weder der Parasitenindex noch der Milzindex allein ein vollständiges Bild der En- bzw. Epidemie gaben; immerhin kam der Milzindex der Wirklichkeit am nächsten. Allerdings war dabei zu bedenken, daß Milzschwellungen auch durch andere Ursachen bedingt sein könnten und in geringem Prozentsatz vielleicht auch waren.

Im Jahresbericht über 1921 war ein Milzindex für Dalmatien von 80,5 Proz. in der Kritik von Dr. Ivanić (Belgrad) als auffallend angegeben und als evtl. Beweis für einen besonderen Endemietypus angesehen worden, zumal da die Malaria in vielen Gegenden nach dem Kriege ihren Charakter geändert habe. Unsere genauen Palpationen im Jahre 1922 konnten nur in Gabela und Opuzen sowie in der Gegend

1) Frischer Malariaherd.

von Muć so hohe bzw. noch höhere Milzzahlen feststellen. Daselbst waren aber nur die sich krank bezw. zur Untersuchung Meldenden in Betracht gezogen worden. Wie aber schon auf S. 341 betont wurde, ist es nicht angängig, nach den Milzbefunden in den Ambulatorien und Kommissionsterminen den Milzindex für die Gesamtbevölkerung anzunehmen. Für den letzteren ist vielmehr nur die Milzuntersuchung aller Einwohner einer Gegend oder zum mindesten unterschiedslose Durchuntersuchung einer Bevölkerungsgruppe (z. B. Schule) maßgebend. Wir glauben, von diesem Gesichtspunkte aus den Milzindex der Gesamtbevölkerung in den am stärksten und längsten infizierten Gegenden (wie Vid, Gabela, Opuzen, Marina) auf 50 bis höchstens 75 Proz. schätzen zu können.

Wie aus Tabelle VII zu ersehen ist, waren Milz- und Parasitenzahlen und ihr Verhältnis zueinander in verschiedenen Malariagegenden verschieden, und zwar so, daß im allgemeinen die ältesten Malariaherde (Marina, Vid, Gabela und Opuzen) die höchsten Milzzahlen und größten Milzen mit und ohne Parasiten aufwiesen. Die höchsten Parasitenzahlen ohne Milz hatten die beiden im Jahre 1922 von einer anscheinend frischen Tropicaepidemie heimgesuchten Orte Drvenik und Dugopolje. In Drvenik war der Milzindex allein nicht wesentlich höher als der Parasitenindex, in Dugopolje sogar niedriger. Umgekehrt fanden sich die höchsten Milzzahlen ohne Parasiten in den alten Malariaherden wie Marina, Vid und Opuzen.

Nach unseren Milzzahlen der Rubriken 1 + 3 in Tabelle VII hätten wir also in den genannten Malariagegenden im Jahre 1922 stellenweise über 70 bis 87,9 Proz. (Gabela) der Bevölkerung als damals oder früher malariainfiziert ansehen können, wenn wir alle Milzschwellungen als durch Malaria bedingt annehmen wollten und wenn wir überall wahllos die Gesamtbevölkerung untersucht hätten. Da wir aber sehr häufig nur die sich als infiziert Meldenden untersuchen konnten, so ist der Milz- und auch der Gesamtindex, auf die Gesamtbevölkerung berechnet, als geringer anzunehmen, selbst wenn man noch den „Parasitenirrtumskoeffizienten“ (vgl. S. 330) mit in Betracht zieht.

Immerhin dürfte der Infektionsindex (Blut- und Parasitenindex), auf die Gesamtbevölkerung berechnet, im Jahre 1922 in manchen Dörfern mindestens 50—70 Proz. (z. B. in Gabela) betragen haben.

C. Anophelesindex.

Der Anophelesindex ergibt sich aus ihrer Menge und ihrem Infektionsindex. Ueber beides ist schon auf S. 346 und 353 ff. eingehend gesprochen.

Der Anopheles-Infektionsindex hängt ebenso — wie die Zahl und Art der Parasitenträger — von der Jahreszeit, der Witterung und Temperatur, ferner von dem Parasitenindex der Bevölkerung ab. Unsere Mitteilungen und Zahlen auf S. 346 haben schon die Unterschiede in der Anophelesmenge im Frühjahr, Frühsommer und Herbst gezeigt, allerdings weniger hinsichtlich des Infektionsindex, da die wenigen diesbezüglichen Untersuchungen nicht als maßgebend gelten können. Vielmehr müßten dazu, wie schon auf S. 354 erwähnt, viele tausende Ano-

phelen untersucht werden, wobei man auch besonders auf die Arten (maculipennis, elutus, algeriensis) genauer zu achten hätte. Auffallend war, daß in einigen Gegenden die Zahl der von uns gefundenen geflügelten Anophelen im Vergleich zu den Malariainfektionen außerordentlich gering zu sein schien. So fanden wir z. B. in Marina im Herbst 1922 trotz intensiven Suchens keine geflügelten Anophelen; und auch die Leute wußten damals nichts von Mückenplage, gaben aber an, daß sie im Sommer Mücken gehabt hätten, allerdings auch nicht sehr zahlreich. — Marina und einige andere Orte (z. B. Dugopolje) erinnerten zunächst an die in der Literatur so oft erwähnte „Malaria ohne Anophelen". Aber auch hier bestätigte sich wieder die alte Erfahrung: „Wer richtig sucht, der findet". Wie schon erwähnt, fanden wir im Herbst und auch im Frühjahr in den Lokwas bei Marina zahlreiche Anopheleslarven, aus denen in wenigen Tagen geflügelte Exemplare ausschlüpften. In Dugopolje, in Mirilović-Zagora und Drvenik entdeckten wir erst nach längerem Suchen ganz vereinzelte Anophelen. Es scheint daher, daß in den Karst- und Poljegebieten gegen Ende des trockenen Sommers die Anophelenzahl ganz außerordentlich gering ist, im Gegensatz zu den Fluß- und Sumpfgebieten des Narentatales, die auch im Herbst weniger, aber immerhin an den meisten Plätzen noch zahlreiche Anophelen aufwiesen. In dem an einem kleinen Binnensee gelegenen Jadrtovac konnten wir Ende Oktober keine Anopheles (selbst nicht in Schweineställen) und keine Brutstätten nachweisen. In solchem Falle muß aber zu anderen Jahreszeiten gesucht werden. Alsdann wird man die Anophelen oder ihre Brut eher finden.

D. Jahreszeitlicher epidemiologischer Gang.

Der epidemiologische Gang der 3 in Dalmatien endemischen Malariaarten ist in weitestem Maße von den jahreszeitlichen Verhältnissen abhängig, so zwar, daß die Tertianafälle bei weitem im Frühjahr und die Tropicainfektionen im Herbst überwiegen. Die Quartanazahlen machen anscheinend nicht so große Schwankungen. Immerhin scheinen sie — namentlich Rückfälle — wie auch in anderen Ländern in den kühleren Monaten nicht unwesentlich seltener, vielleicht gar häufiger zu sein.

Wir haben also in Dalmatien ausgesprochenen Saison-Malariatypus.

Die Doppelinfektionen (vgl. S. 331) scheinen nach unseren Beobachtungen in den Frühjahrs- und Herbstmonaten am zahlreichsten aufzutreten und zwar so, daß man im Frühjahr häufiger vereinzelte Tropicahalbmonde neben vorwiegender Tertianainfektion und im Herbst spärliche Tertianaparasiten neben heftiger Tropica findet.

E. Geologische Malariatypen.

Wenn auch die Infektionszahlen nicht immer in direktem Verhältnis zur Menge der Anophelen zu stehen scheinen, so ergibt sich doch aus dem auf S. 345 ff. Gesagten, daß die Anopheleszahlen von den geologischen und Wasserverhältnissen des Landes in weitestem Maße abhängig sind.

Nach den geologischen Verhältnissen kann man 4 Haupttypen von Malariagegenden in Dalmatien unterscheiden, zwischen denen Uebergänge vorkommen:

1) Sumpfebenetyp. Beispiel: das über 20 km lange Narentatal von der Mündung bis Metković mit einem mindestens 200 Quadrat-

kilometer umfassenden Sumpf- bzw. zeitweiligem Ueberschwemmungsgebiet, an dessen Rändern — wie schon im letzten Jahresbericht beschrieben wurde — etwa 15000 Menschen wohnen, die alle Malaria gehabt haben sollen. Die Narenta steht durch viele Seitenkanäle bezw. Bäche mit der ganzen sumpfigen Ebene in direkter Verbindung. Da die Ebene zum Teil unter dem Narentaspiegel liegt, selbst zu Zeiten geringen Wasserstandes, so findet man an vielen Stellen während des ganzen Jahres Wasser. Zum Teil handelt es sich dabei um mit der Narenta in Zusammenhang stehende Ueberschwemmungs- und Grundgewässer, zum Teil aber auch um Wässer, die aus Quellen stammen, wie man sie z. B. am Wege von Metković nach Vidonje sieht und welche Abflüsse der großen Wassermassen des Popovo-Polje bilden.

Infolge aller dieser zahlreichen Wasserflächen ist natürlich im Narentatal die Luftfeuchtigkeit eine größere, als z. B. in den trockenen Karstgebieten. Und auch in der Nähe der Wohnungen bleiben selbst im heißen Sommer (wie z. B. 1922) vielfach Wasseransammlungen in Gräben und Tümpeln, die ja — wie schon auseinandergesetzt — die Hauptbrutplätze der Anophelen sind, länger bestehen als in anderen Gebieten. Daher der Anophelesreichtum in dieser Sumpfebene.

Die Hauptmalariaherde mit Sumpfebenetyp im Narentatal sind Metković, Vid, Gabela, Opuzen, Novo-Selo, Vidonje, Dobranje u. a.

Kleinere sumpfige Ebenen gibt es noch mehrere an der dalmatinischen Küste im Zusammenhang mit kleineren Wasserläufen, z. B. in den Malariagegenden Stobrić und Stržanac bei Split, ferner auch bei Salona (bei Split) und in der Umgebung von Trogir. Bei Jadrtovac (bei Sibenik) veranlaßt ein kleiner Binnensee Sumpfbildungen und wahrscheinlich auch Anophelesbrutstätten.

2) Polje-Hochplateautyp. Hier handelt es sich um mehr oder minder große Hochebenen (200—450 m über Meereshöhe), die meist ringsum von Gebirgszügen eingeschlossen sind. Sie werden teils von Flüssen oder Bächen durchzogen, teils haben sie kleinere oder größere Dauerseen und Tümpel. Das Charakteristische ist aber, daß in den Poljes (= Felder) zur Zeit der großen Regen sich das Wasser von den umliegenden, zum Teil hohen Bergen zu großen seeartigen Ueberschwemmungsgebieten sammelt (z. B. in dem großen Popovo-Polje), aus denen das Wasser erst im Frühjahr und Sommer allmählich wieder in den Boden ein- bzw. sonstwie (durch Flußläufe oder unterirdisch) abzieht. Diesen Ueberschwemmungen verdanken die großen Felder-(Polje-)Flächen im dalmatinischen Gebirgs-Hinterland ihre Fruchtbarkeit, aber auch die Malaria. Sie repräsentieren sich — z. B. auf der Fahrt nach Ragusa vom Zuge aus gesehen das riesenlange Popovo-Polje — wie große Oasen mit grünen Wiesen und fruchtbaren Aeckern und Gärten in einer majestätischen Steinwüste.

Zu den schlimmsten Malariagegenden mit derartigem Poljetyp gehört Dugopolje. Hier handelt es sich allerdings um ein kleineres Polje.

3) Karst-Hinterlandtyp. Das baum- und teils fast strauchlose dalmatinische Karstland ist im übrigen, abgesehen von kleineren Regenwasseransammlungen, völlig trocken und äußerst arm an Quellen. Und doch finden sich auch in diesen Gegenden da, wo Menschen sind, Anopheles- und Malariaherde. Wir kennen ja auch andere hoch-

gelegene Malariagegenden von ganz ähnlichem Charakter, selbst bezüglich der Vegetation, so z. B. in Palästina (Jerusalem) in Höhe von 700—800 m. Dort entwickeln sich die Anophelen in den Zisternen, die als Sammelbehälter für das Regenwasser von den Dächern und Straßen dienen. Auch im wasserarmen dalmatinischen Karstland (selbst an der Küste) pflegt man das Regenwasser oft in ähnlicher Weise in Zisternen zu sammeln, die dann in der Nähe der Häuser liegen und das Trinkwasser liefern. Zum Teil hat man aber auch für die ganze Gemeinde als zentrale Wasserversorgung große Zisternen mit großen Wassersammelflächen gebaut (z. B. in Opuzen, Vrpolje, Drvenik, Bristewiza u. a.). Außerdem existieren hier und da (namentlich an der Küste) auch Brunnen. Diese großen Zisternen könnten eine einwandfreie Wasserversorgung garantieren, wenn sie besser gehalten und zur Wasserentnahme mit Pumpen versehen wären, anstatt daß jeder — wie bisher — sich mit seinem mitgebrachten Eimer das Wasser heraushölt. Auch könnte man sie nach Pumpenanlage anophelesdicht abschließen. Zwar scheinen nach unseren bisherigen Ermittlungen die Zisternen in Dalmatien bei der Anopheles-entwicklung keine oder jedenfalls keine wichtige Rolle zu spielen. Immerhin wäre es aber denkbar, daß sie doch nach Ausschaltung der anderen Brutstätten von den Anophelen aufgesucht würden.

Manche Zisternen sahen wir — z. B. die große Zisterne bei Bristewiza — in trostlosem, völlig unbrauchbarem Zustand, während man statt Zisternenwassers das Wasser aus der unmittelbar daneben gelegenen offenen, schmutzigen Lokwa, selbst als Trinkwasser holte.

Die sog. Lokwas (vgl. auch S. 349) sind für das dalmatinische Karstgebiet charakteristische, mehr oder minder große, offene Regenwasser-Sammellöcher im Karstgestein, teils innerhalb, teils außerhalb der Dörfer gelegen. Sie liefern häufig den Menschen und namentlich auch dem Vieh das Trinkwasser und den Anophelen ihre Brutstätte. Ohne die Lokwas hätten die dalmatinischen Karstgebiete vielleicht keine Malaria. Die Anophelen entwickeln sich aber nur in Lokwas mit relativ reinem Wasser und passender Vegetation (vgl. S. 348/49).

Zu den Karst-Hinterlandtypen zählen wir z. B. die Malariagegenden von Sevid-Račice (60—100 m ü. M.), Mirilović-Zagora (320 m ü. M.) und Muč und Umgegend (458 m ü. M.), zum Teil die Gegend von Drniš (320 m. ü. M.), Bristewiza-Bliesna (ca. 200 m ü. M.) u. a.

4) Karst-Küstentyp. Hier gilt im allgemeinen das unter 3) Gesagte, nur mit dem Unterschied, daß in den Küstengebieten die Luftfeuchtigkeit durchweg eine größere ist als in dem trockenen Hinterland. Also auch hier sind die Lokwas die Anophelesbrutstätten. Da, wo an der Küste die Lokwas fehlen und eine Leitungswasser-Versorgung existiert, z. B. in Šibenik, Split, Makassar u. a., fehlt auch die Malaria-En- und -Epidemie.

Zu dem Malaria-Karst-Küstentyp zählen die Herde in Marina, Vinišće und auch einige Inseln, wie z. B. Drvenik und Krk.

F. Malariaübertragungen und -Verschleppungen.

Fragen wir uns nun nach der vermutlich häufigsten Art bzw. dem Ort der Uebertragung, so weisen namentlich die Hausepidemien daraufhin, daß auch in Dalmatien die Anopheles als „Haustier“ in erster Linie in den Wohnstätten die Malaria verbreitet, und zwar am meisten in den armseligsten, niedrigsten und schmutzigsten Hütten. Freilich können auch Uebertragungen im Freien, vor allem des Nachts bei den Wächtern auf dem Felde erfolgen. Besonders häufig infizieren sich auch die Gebirgsbewohner, die im Sommer-Herbst zu den Feldarbeiten mit ihrem Vieh in die Malarianiederungen herunterziehen und dort in primitiven Strohhütten wohnen, oder die zu Handelsgeschäften u. dergl. (zum Mahlen von Getreide) in die Ebene oder andere Malariagegenden kommen und daselbst übernachten müssen.

Auch in Ställen sind Uebertragungen möglich, namentlich bei dem häufig dort oder ganz in der Nähe schlafenden Personal. Auf die Bedeutung der engen Symbiose von Mensch, Vieh und Anopheles für die Malaria-Uebertragungen in Dalmatien ist auf S. 346 ff. eingehend hingewiesen.

Daß auch Uebertragungen in Schulen und Gasthäusern denkbar sind, geht aus den Ausführungen auf S. 346 hervor. Die Anopheles maculipennis sticht ja auch am Tage, wie wir in Dalmatien und früher auch in anderen Malariagegenden (z. B. Jerusalem und Mazedonien) wiederholt an uns selbst feststellen konnten. Im Hamburger Tropeninstitut führen wir auch zu jeder Jahreszeit künstliche Mückeninfektionen durch Saugenlassen von Malariablut am Tage aus.

Weiterhin ist nun aber auch noch eine Verschleppung von Malaria aus Malariagegenden in malariafreie Dörfer usw. denkbar, und zwar durch Parasitenträger oder durch infizierte Anophelen. Durch Parasitenträger dann, wenn solche in Anopheles-Gegenden zuziehen. Auf diese Weise sind wahrscheinlich manche der Nachkriegsepidemien, z. B. die Tropicaepidemien in Drvenik, Lučane und Dugopolje zu erklären. Auf der Insel Drvenik soll (z. B. nach Dr. Paladino) erst nach dem Kriege endemisch Malaria aufgetreten sein. Und auch in Lučane und Dugopolje waren solche Tropicaepidemien, wie im Jahre 1922, früher unbekannt. Die Malaria tropica hat nach dem Kriege in vielen europäischen Gegenden gewaltig zugenommen bzw. ist daselbst eingeschleppt worden, offenbar durch Parasitenträger von den verschiedensten, namentlich den Balkankriegsschauplätzen, so zweifellos auch zum Teil in Dalmatien. — Auffallend ist, daß im Sommer 1922 auch in vielen Gegenden Rußlands bis zur Wolga und zum Kaukasus hin und in Italien die Tropica neu bzw. viel heftiger auftrat als in früheren Jahren, während sie allenthalben 1923 nach unseren bisherigen Informationen sicher abgenommen zu haben scheint. Das Jahr 1922 war offenbar ein sogen. „Malariajahr“, in dem die Entwicklungsbedingungen für die Ueberträger und die Parasiten in den Anophelen besonders günstig gewesen sein müssen.

Daß infizierte Anophelen auch mit dem Vieh, mit Eisenbahnen, Wagen und selbst durch Schiffe aus Malariagegenden weithin transportiert werden und so Malaria verschleppen können, ist längst bekannt. Die Gefahr einer Verschleppung von Metković oder Marina bzw. Drvenik durch Dampfer geht z. B. aus unseren auf S. 346

mitgeteilten Anophelenfunden auf einem zwischen Metković und Split verkehrenden Passagierdampfer hervor, auf dem sich nach Verlassen von Metković, namentlich im Mannschaftsschlafraum, zahlreiche Anophelen fanden.

G. Die sozialen Verhältnisse in den Malariagegenden.

Wer die Malaria-Epidemiologie voll und ganz verstehen will, muß sich auch mit der sozialen Lage der befallenen Bevölkerung befassen. Wir haben sie in den von uns besuchten Dörfern eingehend studiert und fanden sie zum Teil trostlos und erschütternd.

In manchen Gegenden genügten die Schulen lange nicht für die gesamte Bevölkerung, in anderen fehlten sie ganz. Die Zahl der Analphabeten in Dalmatien wird auf mindestens 85—90 Proz. geschätzt; ein Kollege gab uns für die Umgegend von Drniš 96 Proz. an. Demnach bleibt die Bevölkerung auf einem überaus niedrigen Kulturniveau stehen, zumal da auch Industriebeschäftigung und dadurch eventuelle Verbindung mit der Außenwelt fehlt. Der Gedankenkreis pflegt bei den dalmatinischen Bauern selten weit über die eigene Heimat, ihre Familie, ihren Acker und ihr Vieh hinauszugehen. Man wohnt eng zusammen und zwar häufig so, daß die Häuser zum Teil in sogen. Nachbarschaften („Komschiluzis") zerstreut liegen: Um einen schmutzigen Hof herum, in den oft die Abwässer aus Wohnungen und Ställen zusammenfließen, liegen die Behausungen mehrerer Familien und die Tierställe. Man lebt also in enger Gemeinschaft mit dem Vieh, mit Rindern, Schweinen, Ziegen, Hammeln und Hühnern, die ja alle in ihren Ställen, wie schon auseinandergesetzt, besondere Anziehungspunkte für die Anophelen bilden. Ob und inwieweit die in den Ställen sich aufhaltenden Anophelen etwa zeitweilig, namentlich nachts bezw. frühmorgens, die Menschen aufsuchen, konnten wir natürlich nicht feststellen. Sicher ist jedoch, daß in Dalmatien die Viehhaltung nicht — wie in anderen Ländern vermutet — durch Anophelesanziehung ein Malariabekämpfungsmittel bildet. Mensch, Vieh und Anopheles leben vielmehr in einer engen Symbiose, zumal da in manchen Gegenden die Ställe einen Teil des Wohnhauses bilden. So z. B. fanden wir in Dugopolje eine ganze Familie mit Tropica infiziert in einer Wohnung über dem Rinder- und Schweinestall (Abb. 4). Auch schläft ja vielfach das Personal in den Ställen. Im übrigen dient der ganzen Familie in der Regel ein einziger Raum als Wohn- und Schlafgemach sowie Küche. Richtige Betten zählen in vielen Gegenden zur Seltenheit. Die Behausungen selbst können vielfach nicht als Häuser bezeichnet werden: es handelt sich um elende, aus Steinen lose zusammengebaute, höchstens 2—3 m hohe Hütten mit einem Strohdach oder mit für Wasser und Wind durchlässiger Ziegelbedeckung. Das Licht tritt häufig nur durch die Oeffnungen im Dach und die Tür ein; andere Hütten haben ein kleines, fensterartiges Seitenloch. Im Innern ist es dementsprechend dunkel, dumpf und muffig, zumal wenn auch in demselben Raum auf offenem Feuer gekocht wird und dementsprechend der Rauch und die Kochdünste neben manchen anderen den ganzen schmutzigen Raum erfüllen. Hier gebärt man, hier ißt und trinkt man, hier schläft man und hier stirbt man.

Daß unter solchen Wohnungsverhältnissen auch andere Krankheiten, vor allem die Tuberkulose, stark um sich greifen müssen, ist ohne weiteres klar. An eine Trennung der Tuberkulösen oder gar an eine Fürsorge für dieselben ist in

den dalmatinischen Dörfern und selbst zum Teil in den Städten vorläufig kaum zu denken. In Šibenik, wo ebenfalls die Wohnungsnot sehr groß sein soll, erzählte man mir, daß in einem Zimmer 7 Leute wohnten, von denen in einer Ecke eine Frau ein Kind gebar, während in der anderen ein Tuberkulöser seine letzten Tage zählte. Die Tuberkulose schafft bekanntlich auch einen günstigen Nährboden für die Malaria und umgekehrt die Malaria für die Tuberkulose.

Als Kleider dienen vielfach nur notdürftig zusammengehaltene Lumpen. Ein regelrechtes Hemd kennen viele Kinder überhaupt nicht, ebensowenig Schuhzeug. So sahen wir in der Schule in Drniš eine Anzahl Kinder ohne Hemd, andere hatten nur noch einige lose Fetzen an Stelle eines solchen. Dementsprechend ist auch die Körperreinlichkeit ein ziemlich unbekannter Begriff. Kinder und Erwachsene starrten vielfach von Ungeziefer, und auch die Krätze ist weit verbreitet. In Dalmatien gibt es nur wenige Häuser ohne Wanzen. In unseren Moskitonetzen gingen sie manchmal morgens in Mengen spazieren. Sie kriechen am Netz in die Höhe oder fallen von der Decke auf das Netz. So ist das Netz auch ein gutes Wanzen-Ablenkungsmittel.

Die Ernährung war — namentlich in den höher gelegenen Karstgebieten — im Januar 1922/23 äußerst dürftig und einseitig. In vielen Gegenden, so in der Umgegend von Drniš (Mirilović-Zagora), hungerte die Bevölkerung nach einer sehr schlechten Ernte buchstäblich. Als wir einige Einwohner fragten: „Wovon lebt Ihr denn eigentlich?" antwortete man uns: „Vom Kummer". Und weiter: „Unsere Gegend ist so arm und nahrungslos, daß uns selbst die Wölfe, deren es hier früher mehrere Rudel gab, verlassen haben". Ein anderes charakteristisches Beispiel aus der Gegend von Bristewiza, wo Maisbrot die Hauptnahrung bildet: Wir wollten einem stark anämischen Jungen mit großer Malariamilz Chinin geben. Da sagte ein dabei stehender Greis: „Wozu denn noch Chinin geben? Laßt ihn doch lieber sterben. Dann ist ihm wohler und wir haben einen Mitesser weniger." In diesen Worten liegt eine ganze Geschichte: die Tragödie des dalmatinischen Karstgebietbewohners!

In der feuchten Ebene ist die Ernährung zwar vielfach besser, aber die Wohnungsverhältnisse spotten dort auch häufig jeder Beschreibung. So kann man verstehen, wenn eine in schwerem Malariafieber daliegende Frau im sogen. Armenhaus in Metković den Ausspruch tat: „Wir leben hier schlimmer als unsere Schweine". Die Frau war aus der Herzegowina zugezogen; aber dort hatte sie es scheinbar auch nicht viel besser gehabt, während andere Bauern daselbst sehr reich sein und zeitweise im Ueberfluß leben sollen. So hörten wir, daß bei einer 8 Tage dauernden Hochzeitsfeier in der Herzegowina 600000 Dinare verpraßt worden sein sollen.

Nach unseren Andeutungen ist es kein Wunder, daß die durch Krankheiten und Hunger schlapp, energielos und entwicklungsunfähig gewordene Bevölkerung wenig Lust zur Arbeit zeigt und immer mehr dem Verfall preisgegeben ist.

Hinzukommen noch die zur Degeneration der Rasse führenden, nicht so seltenen Verwandten-Ehen sowie der in manchen Gegenden neben dem übermäßigen Tabakgenuß Orgien feiernde Alkoholismus. Dalmatien ist, namentlich in seinen Küstengebieten, sehr reich an Wein. Dieser wird aber nur zum geringeren Teil als Exportartikel verwertet, vielmehr in zahlreichen Orten größtenteils im Lande konsumiert, ebenso wie der aus den Weintraubenresten gewonnene Branntwein. Im Narentatal und auch sonst an der Küste, zum Teil auch im Gebirge, trinkt die ganze Bevölkerung, solange sie kann; selbst Frauen und sogar Kindern gibt man vielfach Alkohol, der im Volksmund als das beste Antimalarikum gilt. In Dugopolje sollen in einer Schänke Sonntags bis 4 Hektoliter Rotwein vertilgt werden. Hat der Bauer kein Geld mehr, dann pumpt er häufig beim Wirt gegen Verpfändung von Haus, Hof und Feldern.

So geht es rettungslos dem Ruin entgegen in einem circulus vitiosus des sozialen Elends: Unterernährung — Alkoholismus — Malaria — Tuberkulose u. a., wie er schlimmer und verderblicher nicht gedacht werden kann.

Hinzu kommt allgemein noch eine durchaus ungenügende ärztliche Versorgung in diesen Stätten des Elends. In Muć z. B. wohnte ein einziger Arzt, ein russischer Kollege, der eine in viele Kilometer weitem Umkreis zerstreut wohnende Bevölkerung von 12000 Seelen (Postinje, Ramljane, Bračević u. a.) zu versorgen hatte. In Drniš waren für 22000 Seelen 3 Aerzte, von denen der eine aber

nicht, der andere nur wenig in die umliegenden Malariadörfer Mirilović-Zagora, Unesić, Mirilović-Polje, Zitnić, Ruzić, Kljaci und Miročić kam.

Nicht wesentlich anders war es auch in vielen Küsten-Karstgebieten, in denen man den Arzt stundenweit herausholen mußte, z. B. aus Trogir für Marina, Vinisće, Sevid-Račice, Drvenik, zum Teil auf dem Seewege.

Das muß alles auch an dieser Stelle in einem Malariabericht zum Ausdruck kommen. Denn nur der wird die Epidemiologie ganz verstehen und eine erfolgreiche Malariabekämpfung in Dalmatien vorschlagen oder durchführen können, wer — wie wir — die Herde dieser Volksseuche aufgesucht und von Hütte zu Hütte bis in die innersten Winkel des sozialen Elends vorgedrungen ist.

VII. Die Bekämpfungsmaßnahmen.

Die Malaria-Bekämpfungsmaßnahmen richten sich bekanntlich gegen die Malariaparasiten im Menschen (Chininbehandlung und -Prophylaxe) sowie gegen die übertragenden Anophelen und ihre Brut.

In Dalmatien waren bis zum Jahre 1922 — auch unter der früheren Regierung — nur die ersteren Maßnahmen in Anwendung gekommen, in Form von mehr oder minder regelmäßiger Chininverteilung. In unserem vorläufigen Bericht vom 3. 11. 1922 hatten wir schon darauf hingewiesen, daß diese Methode allein nicht genügte und in ihrer bisherigen Form mancher Verbesserung bedürfe: „Selbst wenn man noch Jahrzehnte in der bisherigen Weise Chinin an die Bevölkerung verteilen wollte, so wird dadurch die Malaria niemals zum Aussterben kommen“. Wir sagten in unserem Bericht weiterhin: „Eine erfolgreiche Malariabekämpfung ist in Dalmatien ebenso wie in anderen Ländern ohne energische Maßnahmen gegen die Anophelen und ihre Brut undenkbar“. Teilerfolge können zwar durch regelmäßige Chininverteilung erzielt werden. Sie vermag aber ebenso wie unregelmäßige und ungleichmäßige Chininisierung in einem Lande wie Dalmatien die Malariagefahr nicht dauernd zu beseitigen. Das haben uns die letzten Epidemien, besonders des Jahres 1922, bewiesen.

Wenn man — wie so häufig — von den Erfolgen der Bekämpfung der Malaria mit Chinin in Malarialändern, so z. B. in Italien berichtet, so handelt es sich dabei meist um Erfahrungen in Gegenden, in denen nicht nur eine allgemeine Behandlung mit „Staatschinin“, sondern auch Chininprophylaxe, zum mindesten bei einem Teil der Bevölkerung regelmäßig durchgeführt wurde. Die Erfolge entsprachen im allgemeinen dem Grade der Regelmäßigkeit in der Anwendung dieser Prophylaxe bezw. Behandlung. Hinzukommen aber — wie wir uns auch in Italien überzeugen konnten — bei wirklichen Dauererfolgen noch verschiedene wesentlich unterstützende Momente, die meist bei der kritischen Betrachtung von Chininerfolgen nicht oder kaum berücksichtigt zu werden pflegen. Unsere diesjährigen Beobachtungen in Italien und Dalmatien und ein Vergleich beider miteinander haben uns — ebenso wie die Kriegserfahrungen — klar gezeigt, daß Chinin alleine nicht zum Dauererfolg führt. Daneben

müssen auch — in vielen Gegenden in erster Linie — energische Bekämpfungs- und Schutzmaßnahmen gegen die Ueberträger in Anwendung kommen. Auch darf die soziale und insbesondere die Ernährungslage der infizierten Bevölkerung nicht außer acht gelassen werden (vgl. S. 363 ff.).

In Italien erfüllen die sogen. „großen Bonifikationen“ (Be- und Entwässerungsanlagen größten Stils) meist in erster Linie landwirtschaftliche Aufgaben; sie tragen aber auch vielfach wesentlich zur Bekämpfung der Anophelen bei: Ungeheure Sumpfgebiete sind entwässert und auf diese Weise weite Strecken fruchtbaren Bodens gewonnen worden. In anderen Gegenden wird trockenen Gebieten Wasser zugeführt und dadurch der Boden für die Landwirtschaft nutzbar gemacht. Diesen Zwecken dienen weitverzweigte Kanalnetze und die zum Ausgleich von Wasserhöhenunterschieden erbauten großen Pumpwerke, deren Anlage und Unterhaltung Riesensummen gekostet hat und jährlich noch einen großen Etat erfordert. Derartige Ausgaben machen sich aber in jeder Hinsicht bezahlt: Nicht nur zum Teil bezüglich der Mücken- und Malariabekämpfung — hier bleibt allerdings noch mancherlei zu wünschen übrig —, sondern vor allem hinsichtlich der landwirtschaftlichen Ergebnisse und der Hebung der Ernährungslage der Bevölkerung. Acker-, Wein- und Obstbau sowie Viehzucht blühen alllenthalben; nicht minder aber auch in den meisten Gegenden der Wohlstand der landarbeitenden Bevölkerung. Zwischen üppigen Obst- und Weingärten, Maulbeerbaumpflanzungen und weiten blühenden Feldern und grünen Wiesen mit weidenden Viehherden sahen wir vielfach in neuen Wohnungen eine zufriedene, gut genährte, gesunde und widerstandsfähige Bevölkerung in früheren sumpf- und wüstenartigen Gegenden. Die in vergangenen Zeiten so gefürchtete, verheerende Malaria spielte an vielen Plätzen kaum noch eine Rolle, trotzdem es stellenweise noch genügend Anophelen gab. Jahrelange Chininisierung und nicht minder vielleicht die gute Ernährung und Unterbringung in relativ sauberen hygienischen Wohnungen hatten die Malaria fast gänzlich zurückgedrängt. In anderen nicht bonifizierten Gegenden des CampoRomano und der Pontinischen Sümpfe, wo die Bewohner stellenweise noch wie früher in armseligen Strohhütten wohnten und nicht selten auch schlecht ernährt waren, grassiert die Malaria noch nach wie vor, wenn sie auch stellenweise dank der Tätigkeit der italienischen Regierung und der vielen Ambulanzen des italienischen Roten Kreuzes bedeutend an Schrecken verloren hat und namentlich die Sterblichkeit wesentlich durch die Chininisierungsbemühungen zurückgegangen ist. Hier haben wir also den besten Beweis, daß selbst eine gut organisierte Chininbekämpfung bei der in sozialem Elend in anophelesreichen Gegenden lebenden analphabetischen Bevölkerung die Malaria nicht auszurotten, höchstens in gewissem Grade zu mildern vermag. Dasselbe gilt auch von Dalmatien und vielen anderen, namentlich auch tropischen Ländern. Die Malaria ist ja in erster Linie eine Krankheit der am wenigsten kultivierten Länder und Volksstämme, namentlich der landarbeitenden Bevölkerung.

Aus dem vorhin Gesagten und dem Kapitel „Epidemiologie“ ergeben sich die für Dalmatien anzuwendenden Bekämpfungsmaßnahmen von selbst. In einem Bericht an die Hygieneabteilung

des jugoslavischen Gesundheitsministeriums vom 10. 5. 1923 haben wir die für die Hauptmalariagegenden erforderlichen Maßnahmen aufgezählt. Sie brauchen daher hier nicht im einzelnen wiederholt zu werden. Jedoch müssen wir auf die aufgestellten allgemeinen Vorschläge nochmals kurz eingehen.

A. Maßnahmen gegen die Parasitenträger.

1) Die bisherige Methode der **Chininverteilung** in Ambulanzen und Kommissionsterminen, bei denen vielfach jeder, der sich Blut zur Untersuchung entnehmen ließ, 5—10 Gramm Chinin in Tabletten bekommt, genügt nicht und hat zu manchen Uebelständen geführt, von denen wir uns wiederholt überzeugen konnten. Zunächst kommt dabei vielfach das Chinin in die Hände von Leuten, die gar keine Malaria haben. Es steht fest, daß viele „Chininhamsterer" bei den Terminen lediglich Chinin holen, um es nachher zu verkaufen oder als Tauschmittel gegen Waren, insbesondere aber gegen Wein zu benutzen, der bei vielen Leuten als ein angenehmeres und besser schmeckendes Antimalarikum gilt. Natürlich ein Unsinn! Denn wenn der Rotwein ein Malariaheilmittel wäre, dann dürfte es an der dalmatinischen Küste und besonders im Narentatal längst keine Malaria mehr geben. Statt dessen nahm sie aber mit dem Alkoholkonsum seit dem Kriege dauernd zu! Zweifellos ist das Chinin, ebenso wie zu Kriegszeiten, einer der besten Valutaartikel — 1 g wurde mit 5—10 Dinaren bezahlt und fand dementsprechend vielfach regelmäßiger in diesem Sinne Verwendung als bei der Malariabehandlung und -verhütung.

Kurz einige typische Beispiele: Ein Junge in Vid, der bei fast jedem Kommissionstermin in Vid Chinin holte und trotzdem dauernd Quartanaparasiten im Blut behielt, gab auf eindringliches Befragen zu, daß er das Chinin nicht genommen, sondern stets seinem Vater auf Befehl habe abliefern müssen. Und der hat es sicher auch nicht in der Form von Chinin eingenommen.

In Opuzen beobachteten wir eine Frau, die ein Kind nach dem anderen (offenbar fremde) zur Blutuntersuchung und Chininentgegennahme schickte und den Kindern dann draußen gleich das Chinin abnahm. Einige Kinder versuchten sogar zweimal am selben Tage Chinin zu holen und hielten das andere Ohr zur Blutentnahme hin.

Nach unserer Ansicht nahmen die wenigsten Chininempfänger das Chinin regelmäßig nach Anordnung, selbst die wirklich Kranken nicht, die zudem bei vielen Kommissionsterminen vielleicht nur 50—60 Proz. der Untersuchten ausmachen. Daher zum Teil die geringen Erfolge.

2) Grundbedingung für den Erfolg einer Chininbehandlung und -Prophylaxe ist somit die **Kontrolle** bzw. Garantie, daß das Chinin auch wirklich genommen wird.

Dies ist allerdings für Gegenden wie Dalmatien leichter gesagt als getan. Einer derartigen Kontrolle stellen sich viele große Schwierigkeiten entgegen. Sicher ließe sie sich nur in Schulen, in den Ambulanzen und Kommissionsterminen durchführen, einigermaßen regelmäßig nur in den Schulen. Würde man in allen dalmatinischen Malariagegenden alle malariainfizierten Schulkinder in gründliche, regelmäßige Behandlung nehmen und in besonders stark infizierten Orten (z. B. Vid, Gabela, Opuzen, Marina, Drvenik, Dugopolje u. a.) auch regelmäßige allgemeine Chinin-Prophylaxe bei den Kindern durchführen können, so würden

auf diese Weise sicher schon eine große Anzahl der gefährlichsten Parasitenträger für die Weiterverbreitung unschädlich gemacht. Eine derartige Behandlung müßte schon in der Vormalariazeit, also spätestens im März beginnen und bis Oktober fortgeführt werden. Dem stehen aber vielfach große Schwierigkeiten im Wege, vor allem das Fehlen von Schulen in vielen Malariagegenden, unregelmäßiger Schulbesuch und die mit der Hauptmalariazeit zusammenfallenden großen Schulferien.

Gerade diese Zeit ist für die Malariabekämpfung sehr wichtig. Man müßte daher zum mindesten in den schlimmsten Malariaorten versuchen, auch während der Ferien die Kinder an bestimmten Tagen zur Chinineinnahme zu veranlassen, etwa Sonnabends und Sonntags. Die Verteilung müßte entweder durch Helferinnen oder durch Lehrer und Pfarrer erfolgen. Diese könnten überhaupt mehr als bisher zur Mitwirkung bei der Malariabekämpfung herangezogen werden, so auch zur regelmäßigen Chininverteilung (in den Mund) bei den nicht in den Schulen zu erfassenden jüngeren und älteren Malariakranken. Die regelmäßige Einnahme des Chinins bildet ja die Grundbedingung für einen Erfolg der Maßnahmen gegen die Parasitenträger und gegen Neuinfektionen. Solange eine solche nicht durchgeführt werden kann, bleiben alle Behandlungs- und Vorbeugungsversuche nur Stückwerk.

Leider mußten auch wir erkennen, daß eine geordnete erfolgreiche regelmäßige Behandlung der nicht in den Schulen zu erfassenden Malariakranken in den meisten Gegenden, namentlich zur Zeit der Feldarbeiten und Ernte, so gut wie unmöglich ist. Es blieben daher nur die beiden folgenden unvollständigen „Ersatzmethoden" übrig:

a) die bisher übliche Veranstaltung von wöchentlichen Untersuchungs- und Chininverteilungsterminen durch Aerzte und Helferinnen in den Hauptmalariazentren. Diese Methode hat aber — abgesehen davon, daß sie nicht alle Malariakranken erfaßt — die bereits oben geschilderten Nachteile. Um wenigstens einen Teil des verausgabten Chinins sicher in den Magen der Patienten gelangen zu lassen, empfehlen wir, bei jeder Chininverteilung in den Ambulanzen und bei den Kommissionsterminen die Patienten die erste Tagesdosis (siehe später) unter Kontrolle sofort schlucken zu lassen, und ferner nie mehr als weitere 10 Tabletten (2 g, für Kinder entsprechend weniger) mitzugeben. Auf diese Weise werden vielleicht auch manche gesunde „Chininjäger" diese Erwerbstätigkeit nicht mehr angenehm und lohnend genug finden.

b) Wo irgend durchführbar, Chininverausgabung direkt in den Mund durch „Chininverteiler" an bestimmten Wochentagen, etwa jeden Sonnabend und Sonntag, zum mindesten an die ermittelten Parasitenträger, beginnend bereits in der Vormalariazeit. Als „Chininverteiler" kämen in Frage: Helferinnen, Lehrer und Pfarrer (event. gegen Vergütung und auch die Desinfektoren, erstere und letztere hauptsächlich in der Nähe von Untersuchungsstationen oder in größeren, stark verseuchten Orten. — In manchen Gegenden, in denen, wie z. B. in Bristewiza, die Leute aus weit zerstreut liegenden Häusern Sonntags in größeren Mengen zusammen-

kommen, könnte vielleicht die Chinineinnahme und -verteilung im Anschluß an den Gottesdienst erfolgen.

Auch diese Methoden haben ihre Nachteile. Sie stellen zudem an die Geduld, Zuverlässigkeit und Pflichttreue der „Chininverteiler" große Anforderungen. — Andererseits könnten zugleich mit der Verteilung Blutentnahmen und Ermittelungen von Haus zu Haus mit gleichzeitiger Aufklärung und Erziehung der Bevölkerung gemacht und zur event. sofortigen Anwendung von örtlichen Maßnahmen (Mücken- und Larvenvertilgung) geschritten werden.

Wie schon angedeutet, müssen die Maßnahmen gegen die Parasitenträger schon in der Vormalariazeit (März/April) beginnen und nicht wie bisher erst im Juni oder gar Juli. Alsdann haben die Parasitenträger schon längst viele Anophelen infiziert.

c) Wir halten die folgenden **Chininanwendungsmethoden** für am leichtesten durchführbar:

1) Bei sicher (klinisch oder parasitologisch) festgestellten Kranken:
zur Behandlung: Chinin an 5 aufeinanderfolgenden Tagen,
„ Nachbehandlung: Chinin 2mal wöchentlich, etwa jeden Sonnabend und Sonntag,
„ Prophylaxe: Chinin 2mal wöchentlich etwa jeden Sonnabend und Sonntag in Schulen Freitags und Sonnabends).

Für Erwachsene gilt im allgemeinen als Tagesdosis 1 Gramm Chinin. hydrochloricum oder (weniger gut) sulfuricum.
Für Schulkinder von 11—16 „ „ 3 „ „ 0,25 „ täglich,
„ „ „ 6—10 Jahren: je 2 Tabletten zu 0,25 g „
„ Kinder „ 3—6 „ „ 2—3 „ „ 0,1 „ „
„ Kinder unter 3 Jahren gibt man am besten Chininlösung nach folgender Formel:

Chinin. hydrochloric.	1,0
Acid. hydrochlor. dil.	0,5
Sir. simpl.	10,0
Aqua ad.	50,0.

Von dieser Lösung bekommen:

Kinder im 3. Lebensjahre:	3mal täglich	5 g,
„ „ 2. „	2mal „	5 „
„ „ 1. „	1mal „	5 „

Wird das eingenommene Chinin wieder ausgespuckt, so muß die gleiche Dosis sofort wiederholt werden.

Ist die Anwendung von Lösungen nicht durchführbar, so kann Chinin in Pulverform in Fruchtsaft, Marmelade, süßer Milch oder dergl. verrührt gegeben werden.

Am besten eignet sich für die Kinderbehandlung das geschmacklose Chininum tannicum, evtl. in Schokoladetablettenform (Erfahrungen in Italien, Palästina u. a.).

In allen schweren bedrohlichen Fällen, namentlich in komatösen, und wenn zahllose Parasiten im peripheren Blut gefunden werden, darf mit der intramuskulären Chinininjektion nicht gezögert werden. Hierzu eignet sich am besten das in kochendem Wasser oder in Ampullen gelöste Chin. bihydrochloricum und das Urethanchinin in Ampullen.

d) Nach unserer Ansicht müssen Mittel und Wege gefunden werden, die verhindern, daß man mit dem verteilten Chinin Handels- und Tauschgeschäfte macht.

Zu dem Zwecke schlugen wir schon in einem früheren Berichte die Einführung von „**Staats-Chinin**" oder zum mindesten von äußerlich leicht, etwa durch Färbung kenntlichen, unter staatlicher Kontrolle hergestellten Chinintabletten vor.

Um eine einfache unterschiedliche Behandlung von kleinen Kindern, Schulkindern und Erwachsenen zu ermöglichen, dürfte sich die Herstellung der folgenden Standard-Dosierungen empfehlen:

a) Für Säuglinge und Kinder bis zu 3 Jahren: die Chininlösung wie auf S. 369 angegeben oder Tabletten wie unter b).

b) Für Kinder von 3—6 Jahren: verzuckerte Chininpillen bezw. Tabletten je 0,1 g Chinin enthaltend, etwa wie die früheren österreichischen Pillen von gelber Farbe.

Für die Kinderbehandlung käme evtl. auch noch die Einführung von Chinin. tannicum-Tabletten (evtl. mit Schokolade) nach italienischem Muster in Frage.

c) Für Schulkinder und Erwachsene: Tabletten zu 0,25 g Chinin, etwa von blauer (durch geringen Methylenblausatz) oder von roter Farbe (Eosinzusatz). Tabletten evtl. verzuckert.

Die bei der Malariabekämpfung zur Verteilung gelangenden Chinintabletten müßten nicht nur auf diese Weise äußerlich kenntlich gemacht, sondern es müßte auch jeder Handel oder Tausch mit solchen Tabletten unter schwere Strafe gestellt werden.

B. Maßnahmen gegen die Anophelen und ihre Brut.

Auf Grund des schon früher über die Lebensgewohnheiten und die Entwicklung der Anophelen und ihrer Brut Gesagten kommen die folgenden praktischen Antimoskitomaßnahmen in Frage:

1) Maßnahmen gegen die geflügelten Anophelen.

a) Erziehung der Bevölkerung zum **Totschlagen** der gesundheitsgefährlichen Anophelen, etwa mit Fliegenklappen, Besen oder dergl., namentlich abends in den Schlafräumen sowie auch insbesondere in den Viehställen; eventuell Abfangen daselbst durch mit Mückenfanggläsern ausgerüstete Schulkinder, vielleicht gegen kleine Belohnungen. Daß dies möglich ist, haben uns Versuche in Opuzen und Vid gezeigt, wo uns Schulkinder in den ihnen übergebenen Fanggläsern in kurzer Zeit Hunderte von Anophelen in den Ställen fingen. Wenn in dieser Weise im Frühjahr und eventuell auch im Winter allenthalben die Schuljugend, wenn möglich unter Leitung der Lehrer, Pfarrer oder Desinfektoren die in Wohnungen und Ställen erreichbaren Mücken nach Möglichkeit vernichten würde, so würde mit jedem getöteten Anopheleswеibchen auch dessen eventuelle zahlreiche Nachkommenschaft unmöglich gemacht. — Mühlens hat mit dieser Methode zum Teil auf dem mazedonischen Kriegsschauplatz durch Erziehung der Soldaten zum Mückentotschlagen gute Erfolge erzielt.

b) **Ausräucherungen** von Wohnungen und Ställen sowie eventuell Kellern u. a. durch Verbrennen von Schwefel oder Dalmatiner Bergblüten (Insektenpulver) kommen bei der Schwierigkeit der Abdichtung dieser Räume kaum in Frage. — Dagegen wäre, namentlich in den Ställen, ein Ausspritzen mit der Giemsaschen Pyrethrumtinktur oder Formalin-Seifengemisch (50 g medizinische Seife und 20 g Formalin auf je 1 Liter Wasser) durch Desinfektoren oder angeworbene Dorfbewohner möglich. Spritzen dazu sind ja allenthalben in Gestalt der Kupfersulfatspritzen vorhanden.

c) **Persönlicher Schutz gegen Mückenstiche.** Der beste persönliche Schutz ist das Schlafen unter einem guten Moskitonetz. Interessant ist, daß die Bewohner in manchen Gegenden Dalmatiens, so z. B. in Vid, Opuzen u. a., zum Teil unter primitiven Netzen aus Leinen oder sonstigen groben Geweben schliefen.

Infolge unrichtiger Anwendung — Herabhängenlassen, ohne die Enden unter die Matratze zu stecken — und von Löchern in den Netzen war leider der Erfolg häufig illusorisch.

Beobachtungen in Italien (nach Gosio) ergaben, daß die Anophelen hauptsächlich frühmorgens kurz vor Tagesanbruch die menschlichen Wohnungen aufsuchen, während sie bekanntlich abends bei eintretender Dunkelheit fensterwärts nach draußen ins Freie streben. Daraus ergäbe sich die Lehre, abends die Fenster usw. zu öffnen und sie frühmorgens geschlossen zu halten. Sitzt man allerdings abends bei Licht, so müßten die Fenster auch geschlossen werden, da das Licht die Anophelen anlockt.

Fenstereinsätze von Drahtgaze, wie wir sie im Malariainstitut in Trogir hatten, sind leider in den primitiven dalmatinischen Bauernwohnungen nicht anzubringen. Dagegen waren schon in österreichischen Zeiten an den Eisenbahnstrecken gelegene Dienstwohnungen nach italienischem Muster gegen Moskitos geschützt. Wir sahen jedoch fast kein Haus mehr, in dem dieser Drahtgazeschutz noch einwandfrei war. Nur das Gebäude der Tabakregie in Metković zeigte einen mustergültigen Moskitoschutz.

2) Maßnahmen gegen die Anophelesbrut.

Aus dem auf S. 348 ff. Gesagten ergibt sich, daß auch in Dalmatien die Anophelesbrutstätten fast stets nur in den kleineren, vegetationsreichen stagnierenden, relativ sauberen Gewässern (Gräben, Tümpeln und Lokwas), und zwar namentlich in der Nähe der Wohnungen und Ställe zu finden sind. Größere Seen-, Fluß- und Ueberschwemmungsgebiete kommen — wenigstens nach unseren bisherigen Ermittelungen — praktisch als Anophelesentwicklungsstätten nicht in Frage. Vielleicht dürften aber in manchen Gebirgsgegenden noch Larven (superpictus?) in Schluchtbächen zu finden sein. — Auch Zisternen konnten von uns bisher nicht als Brutplätze nachgewiesen werden.

Die **Antilarven-Maßnahmen** sind daher relativ leicht an den gefährlichsten kleinen, leicht erreichbaren Brutstätten auszuführen. Vor allem ist der frühzeitige Beginn mit solchen Arbeiten im Frühjahr in der Nähe der Wohnungen von allergrößter Wichtigkeit.

Die Hauptmaßnahmen sind im einzelnen folgende:

a) Zuwerfen von kleineren Tümpeln (Abb. 14).

b) Reinigen der größeren, nicht ableitbaren Tümpel (z. B. der Lokwas) von ihrer Vegetation und Vernichten der Larven — wenn vorhanden — durch Petrolisierung, etwa alle 2—3 Wochen in der Gefahrzeit.

c) Das von Herrn Direktor Apfelbeck empfohlene „Ausfischen" der Larven in den Lokwas mit großen Larvenfangnetzen fanden wir zu mühevoll und namentlich in den Händen von Unterpersonal zu unzuverlässig. Auch müßte es — nach Reinigung der Lokwas — tagelang wiederholt werden.

Freilich dürften sich für die Petrolisierung mitunter Schwierigkeiten bieten, da, wo der betreffende Anophelesbrutplatz die einzige Wasserquelle für Mensch und Vieh bildet. In diesem Falle wäre vielleicht das Ausfischen das einzige Mittel. Im übrigen aber findet man in den meisten Gegenden mehrere Lockwas, die man dann zu verschie-

denen Zeiten nacheinander petrolisieren kann, so daß eine immer benutzbar bleibt. Zudem schaden die geringen, auf der Wasseroberfläche schwimmenden, bald verdunstenden Petroleummengen dem Vieh nicht.

d) Für die Lokwas käme eventuell noch die Kultivierung von larvenfeindlichen Fischen (Gambusia affinis aus Italien) in Frage.

e) Reinigung und Drainage (glattes Abstechen der Ränder) der Wiesen- und Chausseegräben im Frühjahr in mindestens 600--1000 m Umkreis. Petrolisierung, wenn Larven vorhanden. Derartige Reinigungen von Gräben fanden wir in manchen Gegenden (z. B. bei Opuzen, Metković u. a. schon ausgeführt (Abb. 11). Man verfolgte damit teils landwirtschaftliche Zwecke, indem man den Schlamm aus den Gräben zum Düngen der Aecker benutzte. So ließe sich bei einer zwangsweisen, gesetzlichen Einführung der alljährlichen, eventuell zweimaligen Grabenreinigung im Frühjahr und Sommer — jeder Grundbesitzer auf seinem Gebiet — eine landwirtschaftlich nützliche Tätigkeit zugleich als Malaria-Sanierungsmittel auswerten.

f) Dasselbe gilt auch für die eventuelle Entwässerung von großen Sumpfgebieten, die dadurch für die Landwirtschaft gewonnen würden. Hier müßten [ähnlich wie bei Opuzen und stellenweise zwischen Metković und Novoselo] tiefe, wasserziehende Parallelgräben angelegt werden, wobei der ausgeworfene fruchtbare Schlamm zur Erhöhung des Bodens zwischen den Kanälen benutzt werden könnte, so daß das Niveau sich dann über den Grundwasserspiegel erheben würde. Durch derartige Parallelgräben in etwa 3 m Abstand zwischen aufgeworfenem Land können weite Schilfsumpfgebiete entwässert und der Landwirtschaft und somit der Besserung der Volksernährung nach italienischem Muster nutzbar gemacht werden.

C. Die allgemeinen Ernährungs- und sonstigen sozialen Maßnahmen

ergeben sich aus dem schon früher hierüber Gesagten. Zweifellos würde in vielen Teilen des Landes durch eine Besserung der Ernährung und durch eine Hebung des geistigen Niveaus der Bevölkerung (allgemeine Schulausbildung) der Kampf gegen die Malaria und andere Seuchen wesentlich erleichtert. Schon in der Schule müssen die Kinder über das Wesen und die Uebertragung der Malaria sowie die Entwicklung der Anophelen aufgeklärt werden. Durch Flugschriften und Plakate (wie sie die Malariastation Trogir herausgegeben hat) sowie durch allgemeinverständliche Vorträge, wenn möglich mit Lichtbildern — wie wir sie an verschiedenen Plätzen gemacht haben — muß die Aufklärung der Erwachsenen herbeigeführt und ihr Interesse für Mitwirkung bei der Durchführung der Bekämpfungsmaßnahmen geweckt werden. Eine derartige verständnisvolle Mitarbeit ist für den Dauererfolg bei der Malariabekämpfung unbedingt anzustreben. Auch das Hilfspersonal muß — wie bisher — eine gründliche Ausbildung in der Malariaschule in Trogir durchmachen: sowohl die Helferinnen (für die wir auch einen Leitfaden[1])

1) P. Mühlens u. A. Sfarčić, Malarija i njeno suzbijanje. Kratko uputstvo za pomoćno osoblje antimalaričnih stanica. Zagreb 1923.

verfaßt haben, der von der Hygiene-Sektion des Gesundheitsministeriums herausgegeben ist), als auch die Desinfektoren und eventuelle sonstige Hilfsarbeiter (Lehrer u. a.).

Die Weiterausbildung der mitarbeitenden Aerzte erfolgte teils im Malariainstitut in Trogir, teils in gemeinsamer praktischer Zusammenarbeit in den Malariagegenden, im Laboratorium und in der Außentätigkeit. Einige hatten auch vorher an einem Kurs im Hamburger Tropeninstitut teilgenommen.

Die Leitung und Kontrolle der Antimoskitomaßnahmen hat unter Oberaufsicht des Malariainstituts in Trogir durch die Leiter der Malariastationen bzw. die Bezirks- und sonstigen Kommissionsärzte zu erfolgen, denen eventuell je 1 Desinfektor oder in den Orten selbst ausgebildete Arbeiter für die Ausführung zur Verfügung stehen müßten.

Neben dem Malariainstitut in Trogir und der Untersuchungsstation in Split müßte die Station in Metković — die zugleich in Zusammenarbeit mit Mostar für die untere Herzegowina mitwirken könnte — wesentlich erweitert und vergrößert werden. Denn im Narentatal befinden sich ja die gefährlichsten Malariaherde.

VIII. Bisherige Bekämpfungsergebnisse. Rückblicke und Ausblicke.

Im vorigen Abschnitt haben wir alle für Dalmatien in Frage kommenden Bekämpfungsmethoden mit ihren Licht- und Schattenseiten systematisch zusammengestellt. Unsere detaillierten Pläne ergaben sich aus den in beiden letzten Jahren auf Veranlassung der Hygiene-Sektion des jugoslavischen Gesundheitsministeriums in Dalmatien angestellten Studien. Letztere wurden ermöglicht durch Gründung eines mustergültigen selbständigen Malariainstituts in Trogir und die Zusammenarrbeit mit dem Zdravstveni Odsek in Split sowie den Kreis- und Bezirksärzten in den Malariagegenden.

Außer dem Malariainstitut in Trogir bestehen noch 2 größere Untersuchungsstationen in Split (Leiter Dr. Bulat) und in Metković (Leiter Dr. Pecotić).

Die Grundbedingungen für eine erfolgreiche **Malariabekämpfung in Dalmatien** sind durch die erstmalige Aufklärung der Parasitologie, der Anophelesfrage und der wichtigsten Punkte der Epidemiologie erfüllt. Dies darf als erster Erfolg der von der jugoslavischen Regierung ohne Rücksicht auf die Kosten so energisch und zielbewußt ins Leben gerufenen Aktion gebucht werden und damit die erste Etappe als abgeschlossen gelten, wenn auch noch einige wissenschaftliche Fragen zu lösen bleiben.

Wir haben uns weiterhin aber nicht damit begnügt, lediglich die Bekämpfungspläne aufzustellen, sondern auch gleich mit Versuchen begonnen, praktische Ergebnisse zu erzielen, und zwar in mehreren Orten verschiedenen Typs, so in Vid (größerer Sumpfebenetyp), in Trogir (kleinerer Sumpfebenetyp), in Drvenik (Karst-Inseltyp), in Marina (Karst-Küstentyp) und in Sevid-Račice (Karst-Hinterlandtyp).

Als Beispiele seien folgende kurz skizziert:

1) In Marina wurden von dem Malariainstitut Trogir aus im Sommer und Herbst 1923 regelmäßig Kommissionstermine ab-

gehalten und Chinin verteilt; dies wurde auch im Winter und Frühjahr 1923 festgesetzt. Außerdem hatte im Herbst 1922 eine gründliche Durchuntersuchung des größten Teils der Einwohnerschaft und dabei Chininverteilung stattgefunden. Im Frühjahr 1923 wurden ferner die einzigen, in den 800—1000 m vom Dorf entfernt liegenden Lokwas ermittelten Anophelesbrutstätten unter unserer Mitarbeit gereinigt und petrolisiert. Bei der Reinigung, d. h. dem Herausziehen der Wasservegetation, bewährte sich ein an 2 langen Seilen befestigtes harkenartiges Instrument sehr gut. — Die Petrolisierungen wurden teils mit einer Obstbaumspritze, teils durch Verteilung des Petroleums mittels an einer langen Stange befestigter petroleumdurchtränkter Lappen vorgenommen. Der Erfolg war prompt: schon nach wenigen Stunden waren alle Larven und Puppen abgestorben. Diese Petrolisierungen, zuerst im Mai 1923 ausgeführt, wurden im Juni und Juli, als sich wieder Larven — aber weniger als im Frühjahr — entwickelt hatten, wiederholt. Da wir anfangs Mai schon große Anopheleslarven und auch bereits Puppen gefunden hatten, so ergibt sich die Lehre, schon im März/April nach Larven zu suchen und eventuell mit den Petrolisierungen zu beginnen. Vor allem muß in den Algeriensis-Gegenden schon frühzeitig (Februar/März) nach überwinternden Larven gesucht werden, da Bifurcatus und Algeriensis ja als Larven überwintern.

2) In Drvenik vernichteten wir ebenfalls die Larven (schon im Herbst 1922) durch Petrolisierung der Lokwas. Ferner wurden bei den Kommissionsterminen die Parasiten- und Milzträger festgestellt und mit Chinin versorgt. Es gelang, den Pfarrer für die Mitarbeit bei der Chininbehandlung zu gewinnen. Nachdem wir die Larven in den einzigen Anophelesbrutstätten, in den Lokwas — in Zisternen fanden sich keine Larven — unschädlich gemacht hatten, war — ebenso wie in Marina — in Drvenik die Malariaausrottung lediglich nur noch eine Frage des regelmäßigen Chinineinnehmens durch alle Parasitenträger sowie der Ernährung. Die Parasitenträger müssen bei wiederholten Durchuntersuchungen ermittelt werden.

3) In Trogir wurde wohl das meiste Chinin verteilt, obwohl Trogir selbst — 1921 ziemlich stark infiziert — schon im Herbst 1922 zu den Orten mit wenig Malaria zählte, während die Umgebung weit mehr aufwies. Alle malariaverdächtigen Fälle in Trogir wurden von den Aerzten dem Institut zur Untersuchung überwiesen, die meisten kamen aber von selbst, da in Trogir die Bevölkerung durch die genannten Flugschriften und durch Lichtbildervorträge besonders gut aufgeklärt war und der Aktion großes Verständnis entgegenbrachte. In den Gärten der unmittelbaren Umgebung Trogirs, wo vegetationshaltige, zum Bewässern der Gärten dienende Wasserlöcher als Anophelesbrutplätze dienten, wurden diese sämtlich in mit Steinen ausgemauerte, saubere, vegetationsfreie Brunnen umgebaut (Abb. 12). Gleichzeitig erfolgte die Assanierung weiterer sumpfiger Gebiete und Gräben (Abb. 13, 14 u. 15). Anfangs Juli 1923 waren die im Mai begonnenen Arbeiten beendet. Schon vor dem Beginn der Arbeiten hatten wir aber bereits die in den Wasserlöchern und Gräben gefundenen Larven (darunter auch zahlreiche Culices) durch Petrolisieren vernichten lassen. In dieser Weise sind die gründlichsten und mustergültigsten Sanierungsarbeiten zunächst bei

Trogir ausgeführt worden. Dementsprechend waren hier auch die besten Resultate zu erwarten, ganz abgesehen davon, daß in Trogir die Malaria schon infolge der Chininbehandlung in Abnahme begriffen war.

Es dürfte natürlich verfrüht sein, schon jetzt die Erfolge endgültig zu beurteilen. Immerhin darf aber erwähnt werden, daß es uns im Juli 1923 trotz eifrigsten Suchens und trotz Aussetzens von Prämien auf jeden Anopheleskopf nicht gelang, in Trogir eine Anopheles zu ermitteln, ebensowenig Larven. Auch hatten wir bis dahin keine einzige in Trogir entstandene Malarianeuerkrankung, dagegen einige Rezidive und einzelne uns vom Vorjahre bekannte Parasitenträger ermittelt, darunter den auf S. 344 erwähnten Mönch mit Halbmonden.

Auch in Marina konnten wir bei wiederholtem Suchen im Juni und Juli keine Anophelen in den Häusern ermitteln. Zur selben Zeit kamen auch nur wenige sich krank Fühlende zu den Untersuchungen. So waren bei einem Termin alle 10 Untersuchten negativ. Weiterhin ließ sich allgemein feststellen, daß die chininisierte Bevölkerung in diesem Sommer durchweg besser aussah und zufrieden war, bisher (Ende Juli) von Malaria frei zu sein. Selbst einige der im vorigen Jahr so kachektisch aussehenden Kinder und Erwachsenen hatten sich wesentlich erholt und in ihrem Aussehen verändert.

Von vornherein hatten wir vermutet, daß die Malariabekämpfung in Trogir und Marina sowie auch in Drvenik und anderen Karstgebieten mit nur wenigen als Brutplätze dienenden Lokwas nicht schwierig und erfolgreich sein müsse. So waren also diese bisher so schönen Ergebnisse für uns keine Ueberraschung[1]).

Andererseits war uns aber auch bewußt, daß die Bekämpfung in den anophelesreichen Narenta-Sumpfgegenden wesentlich schwieriger sein würde. Daher erwarteten wir auch hier nicht derartige Erfolge, zumal da mit Antimoskitomaßnahmen erst spät und nur in geringem Umfange gegen die Anophelen und ihre Brut vorgegangen werden konnte. Diese Maßnahmen spielen aber im Narentatal mit die Hauptrolle. Alleinige Chinisierung wird eine so anophelesreiche Gegend niemals malariafrei machen können. Ein Vergleich dieser beiden geologischen Malariatypen (Karst- und Sumpftyp) im selben Lande und der Malariabekämpfungsergebnisse in beiden Gegenden illustriert am besten die Notwendigkeit der Maßnahmen gegen die Anophelen und ihre Brut.

Zwar waren bis Ende Juli 1923 auch im Narentatal die Malariazahlen wesentlich geringer als im Vorjahre zur selben Zeit; aber es ist schwer zu entscheiden, ob es sich dabei schon um Bekämpfungs-, speziell Chininerfolge handelte. Denn das Jahr 1923 schien ja nach unseren bis zum Juli 1923 gewonnenen Eindrücken ganz allgemein kein so heftiges „Malariajahr" zu sein wie das Vorjahr, trotz Vorhandenseins von zahlreichen Anophelen im Narentatal. (Denselben Eindruck hatten wir auch in Italien und er wurde uns im August von Prof. Gosio auf Befragen brieflich bestätigt). Ein endgültiges Urteil dürfte sich erst nach der Malariasaison bezw. im nächsten Jahre ermöglichen lassen.

---

1) Auch im Jahre 1924 blieben diese Resultate günstig.

Jedenfalls bleibt im Narentatal, dem wichtigsten und am schwierigsten zu bekämpfenden Malariazentrum, noch viel schwere Arbeit gegen Parasiten und Anophelen. Hier paßt der für die Malariabekämpfung von Prof. Gosio gebrauchte Vergleich von dem „Prisma mit tausend Flächen". Und doch ist gerade die Lösung der schwierigsten Probleme die reiz- und ehrenvollste. Gründlich und für alle Zeiten kann das Malariaproblem für das Narentatal vielleicht nur in Zusammenarbeit mit Ingenieuren durch einen großzügigen Bonifikationsplan gelöst werden. Seine kost- Ausführung würde sich durch enorme Gewinne an fruch- Land sowie dem kostbarsten Gut, der Gesundheit seiner kaum 1/2 Millionen zählenden, zum Teil aussterbenden Bewohner sicher lohnen. Inzwischen kann aber auch eine strenge Durchführung unserer im ein- zelnen vorgeschlagenen kleinen Sanierungsmaßnahmen sicher schon eine wesentliche Besserung der Gesundheitslage herbeiführen.

Möchte alsdann das an Naturschönheiten, Kulturdenkmälern und Bodenschätzen so reiche dalmatinische Küstenland, das mit seinen 5 Millionen Bewohnern im alten römischen Kaiserreiche zu den wohlhabendsten und zivilisiertesten Provinzen gehörte und Männer wie Diokletian und Aurelius zu den Seinen zählte, wieder zu frischem Leben, zu neuer Kultur und zu dauernder Blüte erwachen.

Abgeschlossen Ende Juli 1923[1]).

Die Messung der Bakterizidie des menschlichen Blutes nach spezifischer und unspezifischer Vorbehandlung.

[Aus dem Hygiene-Institut (stellv. Direktor: Prof. Dr. C. Prausnitz) der Universität Greifswald.]

Von **Carl Prausnitz** und **Gertrud Meissner**.

Mit 3 Abbildungen im Text.

Der Abwehrkampf des Körpers gegen eindringende Mikroorganismen hängt von seiner Fähigkeit ab, die Verteidigungsmittel rasch zu mobilisieren. Als solche kommen sowohl humorale wie zelluläre Mechanismen in Betracht. Nach der heute am weitesten verbreiteten Annahme haben die humoralen Immunkörper die wichtigste Aufgabe der Verteidigung: die Bakterizidie (insbesondere die Bakteriolyse) und, nach den Untersuchungen von Pfeiffer und Bessau, den fermentativen Abbau des Bakterienendotoxins; die Phagozyten scheinen im wesentlichen nur die bereits geschädigten, und die Trümmer der zerstörten Bakterien durch ihre Freßtätigkeit zu beseitigen. Daß aber die bakterienwidrigen Stoffe im Blut und Lymphplasma immunisierter Tiere letzten Endes aus gewissen Zellen stammen, ist für die Agglutinine und Bakteriolysine durch die grundlegende Arbeit von R. Pfeiffer und Marx bewiesen worden: sie stellten fest, daß zu einer Zeit,

1) In serbischer Sprache mit 48 Abbildungen unter den Veröffentlichungen des „Ministarstvo Narodnog Zdravlja, Belgrad" im Jahre 1924 erschienen. Zagreb 1924

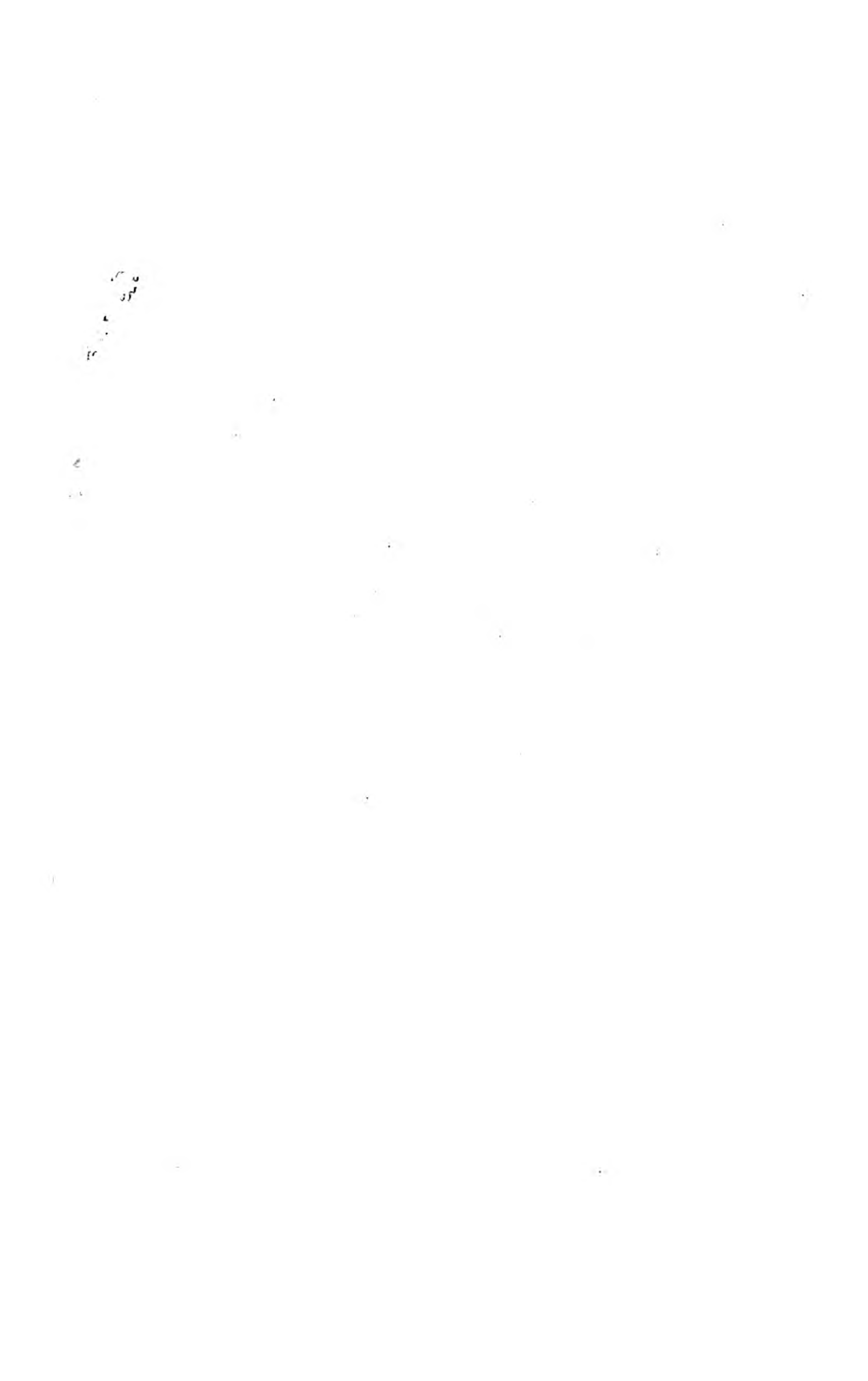




Fig. 1. Malariakranke Schulkinder aus Vid. Rechts im Hintergrund unter dem Treppenaufgang Anopheles-Aufenthaltsort.



Fig. 2. Fangen von Anophelen unter dem in Fig. 1 bezeichneten Treppenaufgang.



Fig. 3. Resultat des Fanges: über 200 Anophelen nach 10 Minuten. — In dem kleinen Käfig 65 Anophelen aus der benachbarten Gasthausstube.

Verlag v

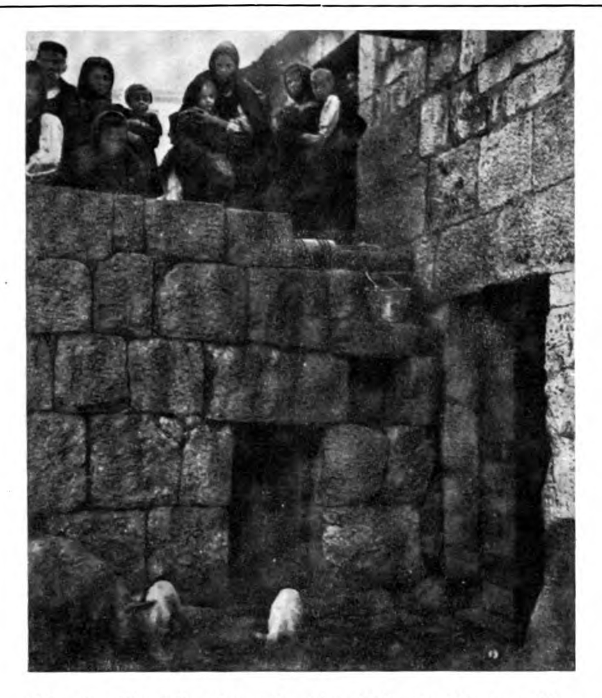


Fig. 4. Tropicakranke Familie in Dugopolje, über dem Rinder- und Schweinestall wohnend.



Fig. 5. Malariamilz VI aus Vinišćé.

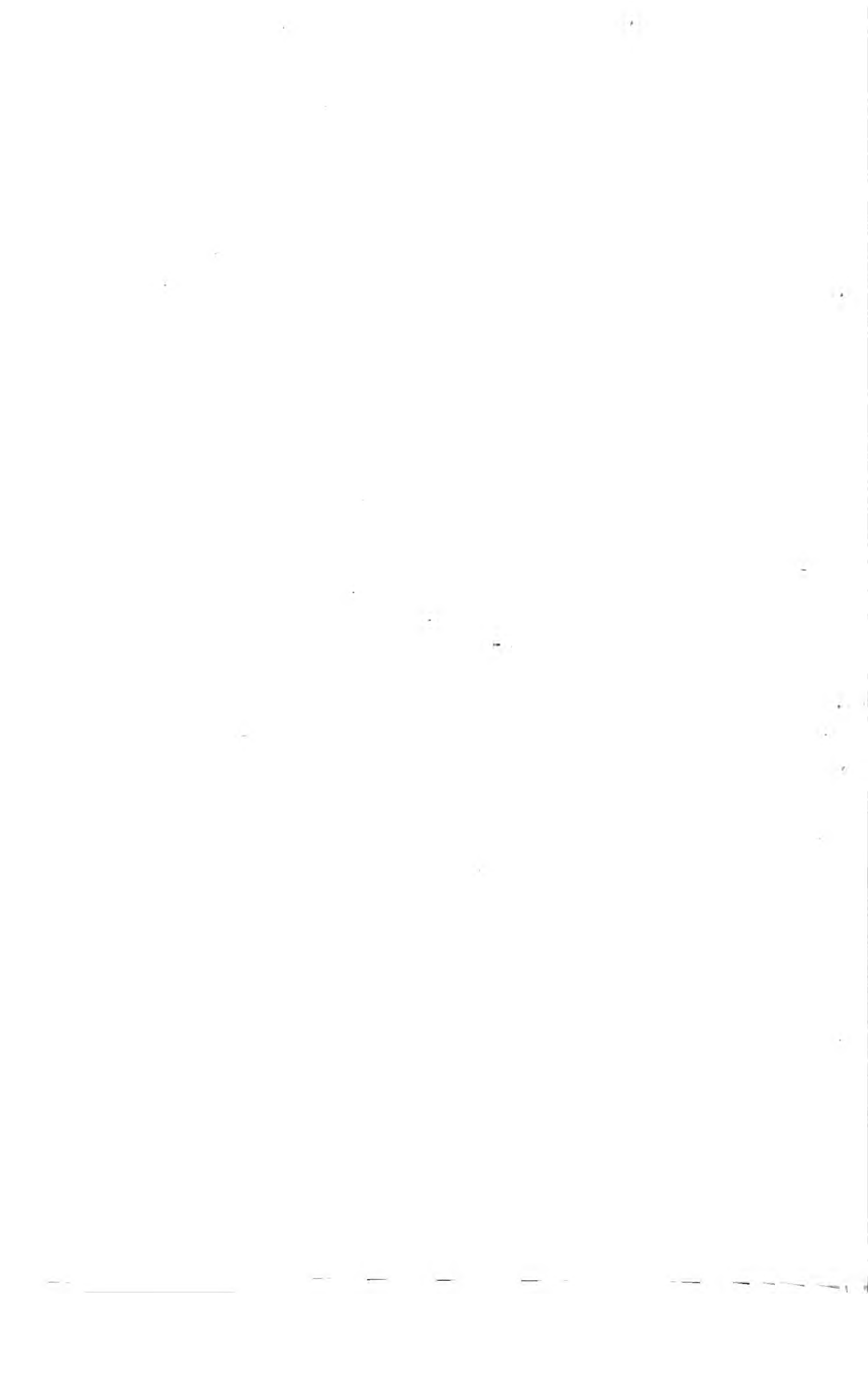


Fig. 6. Frauen mit Milz IV bezw. VII aus Vid b. Metković.



Fig. 7. Kind mit Milz VII aus Gabela.

stav Fischer in Jena.



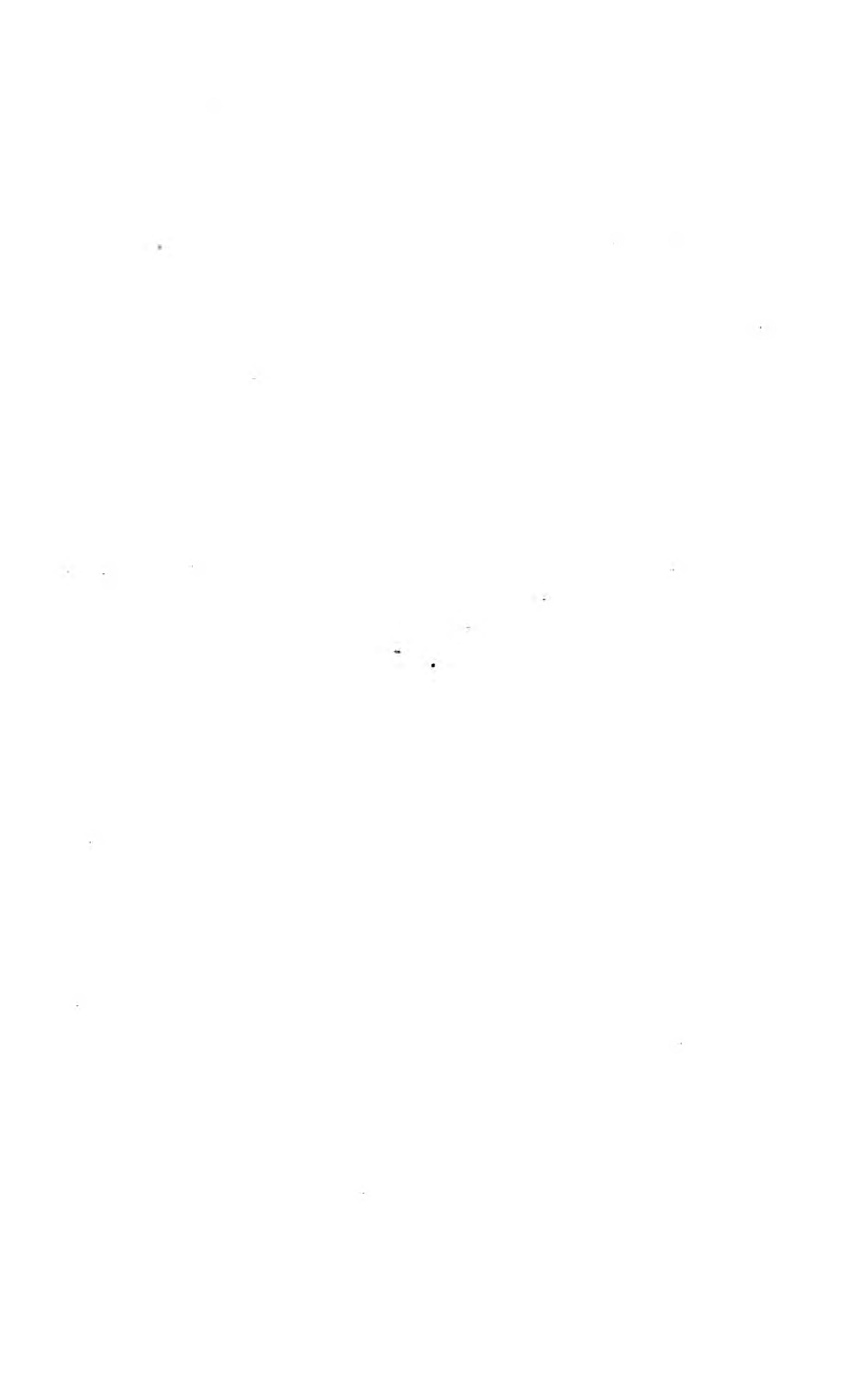




Fig. 8. Lockwa bei Marina, typischer Anophelesbrutplatz im Karstgebiet.

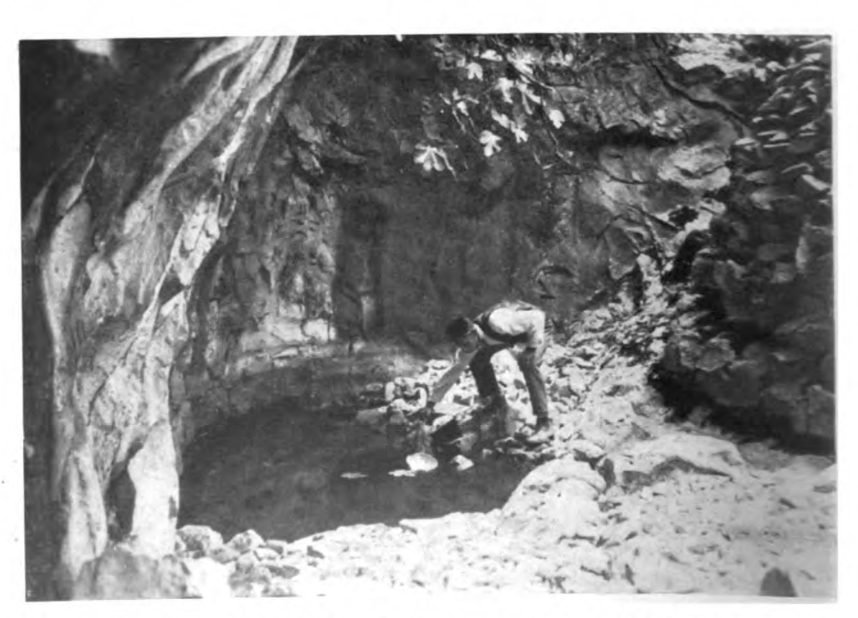


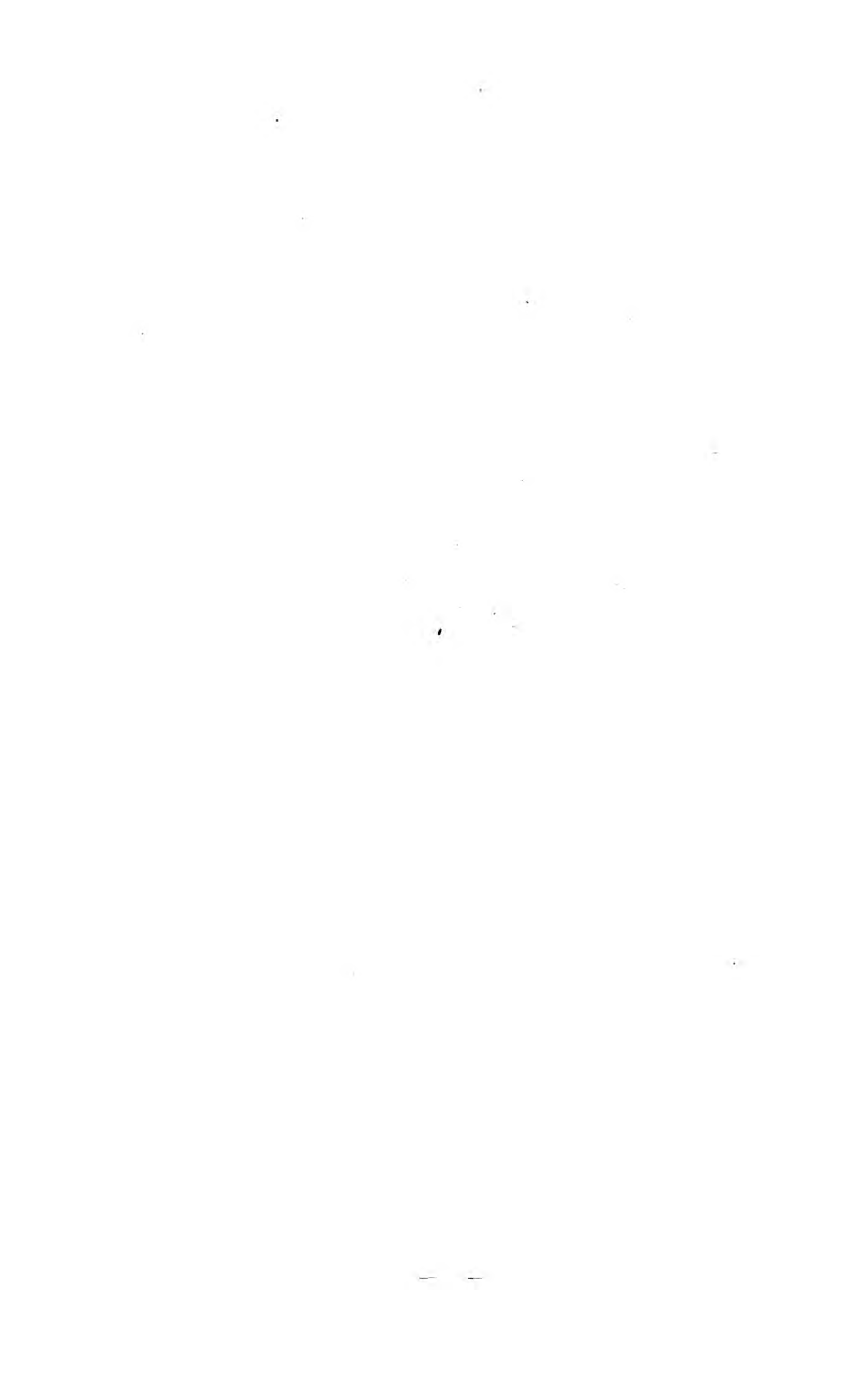
Fig. 9. Lockwa in einer Felsengrotte in Vinišće (Anophelesbrutplatz)



Fig. 10. Typischer Anophelesbrutplatz im Sumpfebenegebiet bei Gabela.



Fig. 11. Gut gereinigter Graben bei Metkovif, ohne Anopheleslarven.



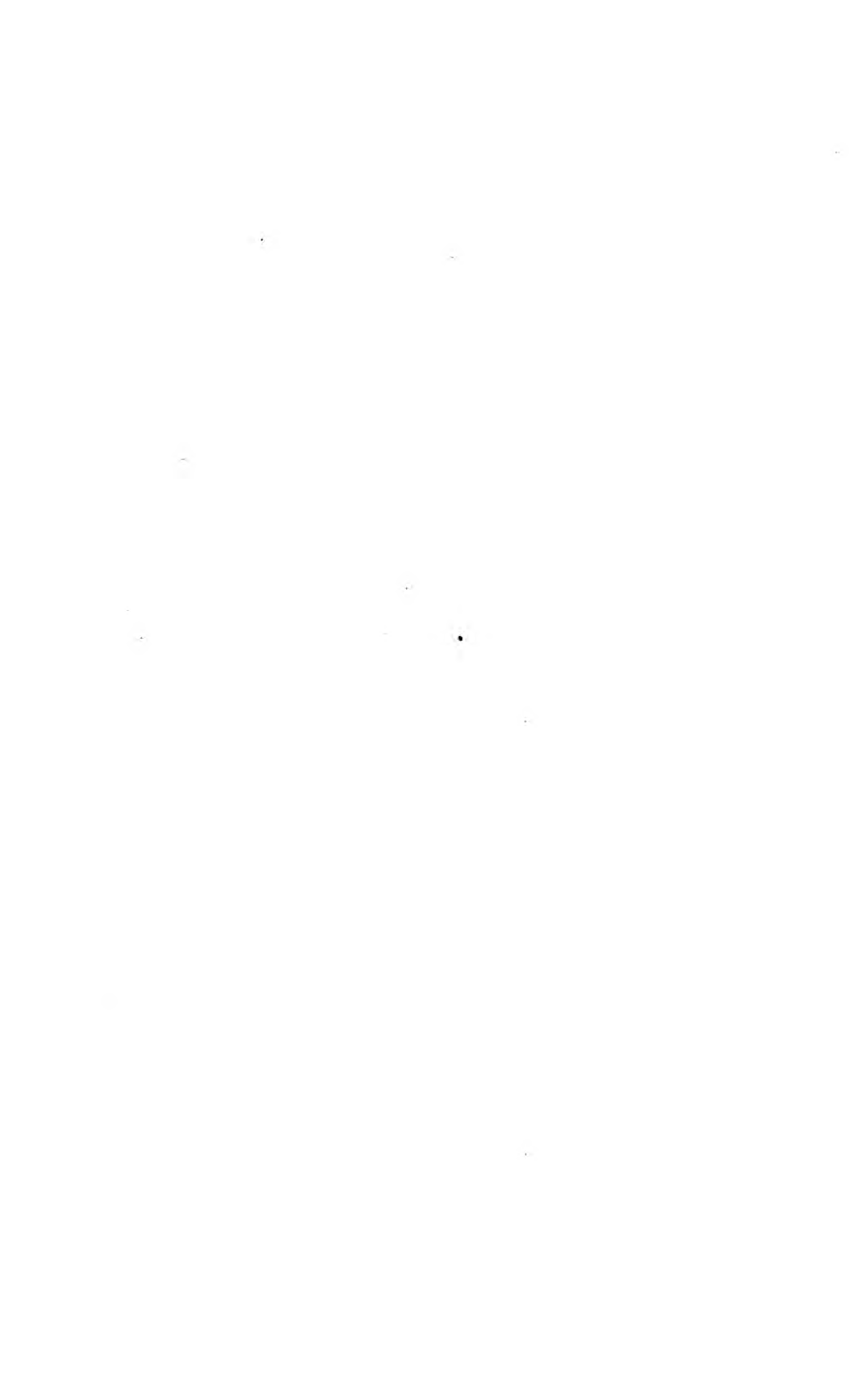




Fig. 12. Gartentümpel bei Trogir, Anophelesbrutplatz. Rechts im Hintergrunde ausgemauerte Zisterne (keine Larven).



Fig. 13. Gut angelegter Entwässerungsgraben bei Trogir.

Verlag von G[illegible]



Fig. 14. Zuwerfen von Sumpfgebiet bei Trogir durch die Bevölkerung.



Fig. 15. Saniertes Gebiet bei Trogir. Links im Hintergrund das Malariainstitut in Trogir.



wo das Blutserum noch keine Immunstoffe enthält, die hämatopoetischen Organe, Milz, Knochenmark und Lymphdrüsen, deutlich nachweisbare Mengen derselben enthalten. Für Immunhammelhämolysine und Typhusagglutinine fand Rautmann entsprechende Resultate beim Vergleich des Milzvenenblutes mit dem Blut anderer Venen. Die Ansicht von Wassermann und Citron, daß auch das Endothel der serösen Häute (Pleura) an der Immunkörperbildung beteiligt wäre, wurde durch die Nachprüfung von Paetsch nicht bestätigt. Auch die Haut spielt hierbei nach den Befunden von C. Neuhaus und C. Prausnitz keine Rolle.

In den letzten Jahren ist nun durch die Arbeiten von Bieling und Isaac gezeigt worden, daß bei entmilzten Tieren nach Blockierung des reticulo-endothelialen Apparates (durch intravenöse Eisenzuckerinjektion) die Bildung von Hämolysinen ausbleiben kann; in analogen Versuchen fanden Neufeld und H. Meyer, daß nach Blockierung des Reticulo-Endothels die Immunität gegen Pneumokokken herabgesetzt ist oder ganz fehlt. Es scheint daher, daß die Bildung der Immunantikörper wenigstens der Hauptsache nach durch die Zellen des reticulo-endothelialen Apparates („ruhende Wanderzellen"—Maximow; Histiozyten—Aschoff und Kiyono) erfolgt.

Bei Infektion immunisierter Mäuse mit Staphylokokken sah Domagk eine sehr starke, fast momentan eintretende Phagozytose der Kokken durch die Endothelien von Leber, Milz, Knochenmark u. a. Aehnliche Ergebnisse hatten Singer und Adler bei der Infektion des Kaninchens mit Pneumokokken (Typ I, II und III): Sowohl bei unvorbehandelten wie bei immunisierten Tieren fand nach intravenöser Injektion eine allerdings nur kulturell nachgewiesene Anreicherung der injizierten Pneumokokken in Milz, Leber, Niere u. a. statt; bei den nicht immunisierten Tieren gelangten die Kokken von da alsbald ins Blut und führten zum Tod des Tieres, bei den Immuntieren dagegen kam es nicht zur sekundären Ausschwemmung ins Blut, die Kokken schienen also durch die Tätigkeit dieser Organe vernichtet zu werden. Bei weiteren Tieren wurde das Knochenmark unmittelbar infiziert: hierbei sahen sie nur in den Immuntieren eine ausgesprochene Phagozytose durch die Histiozyten. Diese Versuche sprechen also für eine grundlegende Beteiligung der Histiozyten an der Vernichtung der in den immunisierten Körper eingeführten Mikroorganismen; man kann diese Ergebnisse einmal so erklären, daß die ins Blut injizierten Mikroorganismen zunächst durch im Blut kreisende, humorale Immunstoffe sensibilisiert und dann — unspezifisch — durch die Histiozyten gefressen werden; es wäre aber auch denkbar, daß die Histiozyten selber durch die Immunisierung so umgestimmt werden, daß sie erst daraufhin zur Phagozytose der Mikroorganismen befähigt werden. Die Entscheidung dieser Frage scheint uns noch auszustehen.

Bei allen bisher genannten Untersuchungen handelt es sich nur um die bei der spezifischen Immunität sich abspielenden Vorgänge. Bei nichtimmunen Tieren und bei unspezifischer Resistenzsteigerung scheinen die Verhältnisse anders zu liegen. Hierfür spricht zunächst die Beobachtung von R. Pfeiffer und Issaeff über die unspezifische Resistenz, welche bekanntlich die Grundlage für die modernen therapeutischen Verfahren der Plasmaaktivierung oder Leistungssteigerung ist, die auf den Arbeiten Weichardts basieren. Pfeiffer und Issaeff fanden nämlich folgendes: spritzt man in die

Bauchhöhle eines aktiv oder passiv immunisierten Meerschweinchens Choleravibrionen ein, so findet rasch unter Granulabildung eine vollständige Vibriolyse statt, noch ehe Leukozyten im Exsudat nachweisbar sind; erst einige Stunden danach treten die Leukozyten in nennenswerter Zahl auf, sie scheinen nur die Trümmer der zerstörten Mikroben aufzufressen. Behandelt man aber die Meerschweinchen unspezifisch, durch intraperitoneale Injektion von Bouillon, Aleuronat usw., so bildet sich ein leukozytenreiches Exsudat; injiziert man nun Vibrionen in die Bauchhöhle, so steht die Phagozytose der morphologisch unveränderten Vibrionen im Vordergrund.

Wahrscheinlich ist daher die Schutz- und Heilwirkung bei der unspezifischen Behandlung zu einem großen Teil auf die Leukozyten, besonders die polymorphkernigen, zurückzuführen. Es liegt nahe, diese Ergebnisse in Parallele zu bringen mit den Untersuchungen von Gruber und Futaki über die Schutzstoffe der Leukozyten (Leukine) und der Blutplättchen (Plakine) bei der Milzbrandinfektion.

In den letzten Jahren hat Wright die Tätigkeit der Leukozyten eingehender erforscht. Bekanntlich wandern aus dem frisch gewonnenen Blut alsbald nach der Gerinnung die Leukozyten zum großen Teil aus dem Gerinnsel an die Wandungen des Gefäßes heraus (Fig. 1). Er konnte nun zeigen, daß die Auswanderung durch gewisse Substanzen je nach der angewendeten Dosis meßbar verringert oder verstärkt wird. Er nahm zu dem Zweck eine Reihe von 1 qcm großen flachen Kammern, die auf der Oberfläche paraffinierter Objektträger durch Aussparungen der Paraffinierung gebildet wurden. In ihnen wurden konstante Mengen fallender Neutralsalzverdünnungen mit konstanten Mengen frisch entnommenen Blutes gemischt; die Objektträger wurden dann in feuchter Kammer 1 Std. bei 37° bebrütet; danach wurde das Gerinnsel entfernt, und der Objektträger fixiert und gefärbt. Man sah nunmehr auf der Objektträgeroberfläche die aus dem Gerinnsel ausgewanderten Leukozyten; in den Kammern mit hoher Salzkonzentration waren nur sehr wenige, bei gewissen geringeren Konzentrationen aber weit mehr Leukozyten ausgewandert als in den unbehandelten Kontrollen. Daher übt das verwendete Salz in starken Konzentrationen eine lähmende, in geeigneten schwächeren Konzentrationen eine reizende Wirkung auf die Leukozyten aus. Dasselbe Bild ergibt sich, wenn man anstatt der Salzlösungen z. B. Aufschwemmungen abgetöteter Strepto- oder Staphylokokken verwendet: auch hier entsprechend dem Arndt-Schulzschen Gesetz Lähmung der Auswanderung durch große, Reizung durch schwache Dosen der Bakterienvakzine.

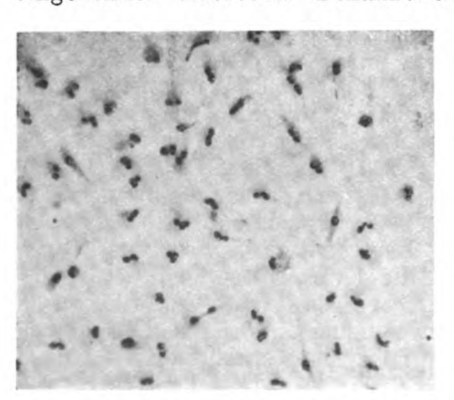


Fig. 1. Auswanderung der Leukozyten aus dem Blutgerinnsel.

Was für die Wanderungsfähigkeit der Leukozyten gilt, hat sich auch für ihre sonstige Tätigkeit als richtig erwiesen. Dies läßt sich in besonders schöner Weise demonstrieren, wenn man das Blut unmittelbar

nach der Entnahme mit Bakterien besät. Die dann auftretende Bakterizidie kann im Agarplattenversuch gemessen werden. Für die Bakterien, die im extravaskulären Blut sich vermehren können, z. B. Staphylokokken, ist das von Wright ausgearbeitete Verfahren vorzuziehen, wobei die Gemische von Staphylokokken mit ungeronnenem oder defibriniertem Blut, in kapillaren Kammern eingeschlossen, bebrütet werden. Die zur Keimzählung nötige Entstehung isolierter Kolonien findet nämlich, wie Wright gezeigt hat, in flüssigen Medien statt, wenn diese in horizontal gelagerten kapillaren Schichten bebrütet werden, so daß die Flüssigkeit vollkommen ruht; natürlich ist das Verfahren nur für unbewegliche Bakterien brauchbar. Das von ihm eingeführte Verfahren beruht auf der Verwendung zweier steriler Objektträger, die durch vaselinierte Papierstreifen von 0,08 mm Dicke von-

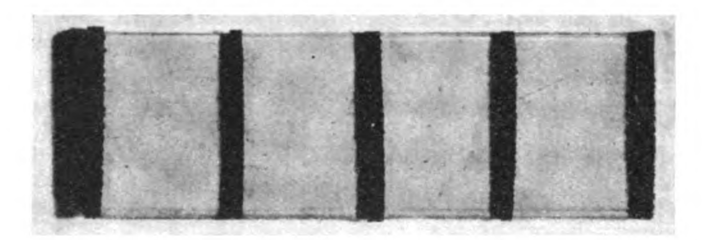


Fig. 2 Objektträgerkammer, leer.

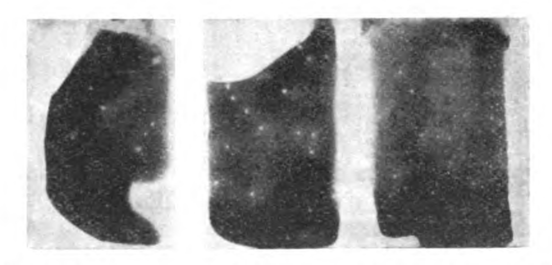


Fig. 3. Objektträgerkammer, mit Blut-Staphylokokkengemisch beschickt und bebrütet.

einander getrennt sind (Fig. 2). In diesen kapillaren Hohlraum kommt das Blut-Kokkengemisch. Die Ränder der Kammer werden mit geschmolzener Paraffin-Vaseline ana abgedichtet und das ganze bei 37° 1—2 Tage bebrütet, wobei sich isolierte, gut zählbare Staphylokokkenkolonien entwickeln (Fig. 3).

Es gelang nun Wright zu zeigen, daß das von Menschen und Kaninchen entnommene defibrinierte, wie auch das geronnene Blut auf zugesetzte Staphylokokken eine — individuell verschiedene aber stets ausgesprochene — abtötende oder entwicklungshemmende Wirkung ausübt. Versetzte er nun eine Reihe von Blutproben ähnlich wie im früher angegebenen Versuch mit fallenden Mengen abgetöteter Staphylokokken, „vakzinierte" er also gewissermaßen das frisch entnommene Blut und fügte 1 Std. später zu allen Proben die gleiche Menge lebender Staphylokokken hinzu, so zeigte sich bei Verwendung der Objektträgerkammertechnik das entsprechende Bild: Gegenüber der unvorbehandelten Kon-

trolle war die Kolonienzahl vermehrt in den Blutproben, die mit vielen toten Staphylokokken vakziniert waren, dagegen zum Teil sehr stark vermindert in einer Probe, die mit einer mittleren Zahl toter Staphylokokken vakziniert worden war. Hier war also eine reizende, die Kampfkraft des Blutes erhöhende Wirkung durch Vakzinierung mit der optimalen Menge toter Staphylokokken erfolgt.

Es fragt sich nun, ob hier nur eine reine Phagozytosewirkung vorliegt, d. h. ein Teil der Bakterien von den Leukozyten gefressen und dadurch von der Entwicklung ausgeschaltet wurde, oder ob die Wirkung wenigstens zum Teil humoral zu erklären ist. Um dies festzustellen, wurden die mit den toten Staphylokokken vakzinierten Blutproben nach 1stdg. Bebrütung bei 37 ⁰ zentrifugiert und die überstehenden Sera auf ihren Opsoningehalt geprüft. Es ergab sich auch hierbei das Gleiche: Verringerung der opsonischen Kraft in den zu stark vakzinierten Blutproben, Erhöhung wesentlich über den Opsoningehalt der unvorbehandelten Kontrolle hinaus bei Verwendung einer gewissen optimalen Vakzinkonzentration.

Im Anschluß an diese in vitro ausgeführten Versuche studierte Wright die Wirkung der intravenösen Injektion toter Staphylo- oder Streptokokken bei Menschen und Tieren auf die Kampfkraft ihres Blutes gegenüber zugesetzten lebenden Staphylokokken und fand im allgemeinen das Gleiche.

Die hier beschriebenen Ergebnisse Wrights sind also in erster Linie unspezifisch bedingt und treten außerordentlich rasch, innerhalb weniger Minuten nach der Injektion im Blut auf. Es handelt sich hier offenbar um die von R. Pfeiffer beschriebene unspezifische Resistenzerhöhung. Um den Unterschied gegenüber der aktiven Immunisierung auch in der Nomenklatur hervorzuheben, bezeichnete Wright die von ihm erforschten Veränderungen als „epiphylaktisch".

Es lag nahe, die Verwendbarkeit der Epiphylaxie in der Behandlung akuter Infektionskrankheiten zu versuchen. Bei den Patienten, deren Organismus durch die Krankheitserreger noch nicht zu schwer vergiftet war, deren Abwehrmechanismus also noch einigermaßen funktionieren konnte, gelang es in der Regel, durch Vakzinierung einen Erfolg zu erzielen. Zuerst wurde in vitro die Dosis Vakzine ermittelt, die in einem gewissen Blutvolumen einen optimalen Verteidigungsreiz ausübte; dann wurde unter Zugrundelegung der geschätzten Blutmenge dem Patienten die entsprechende Vakzindosis — meist intravenös — eingespritzt. In der Regel wurde eine beträchtliche Steigerung der abtötenden Kraft des Blutes, und Hand in Hand damit eine rasche klinische Besserung beobachtet.

Bei den Patienten aber, die durch ihren septischen Zustand stark vergiftet waren, erwies sich sowohl in vitro wie in vivo die Fähigkeit des Blutes, auf die Vakzinierung zu reagieren, als stark herabgesetzt oder sie fehlte ganz. Für solche Fälle hat Wright das Verfahren der „Immunotransfusion" eingeführt.

Die Transfusion ist bekanntlich schon vielfach mit wechselndem Erfolg in der Sepsisbehandlung verwendet worden. Der eine von uns hat in einem scheinbar verzweifelten Falle puerperaler Streptokokken-Thrombophlebitis durch mehrere gleichzeitige Gaben von polyvalentem Streptokokkenserum + frischem Normalmenschenserum eine rasche und auffallende Heilung erzielt. Aehnliche Erwägungen dürften Schön-

bauers Versuchen zugrunde gelegen haben, der bei Hunden mit gutem, bei Menschen ohne sicheren Erfolg das Blut artgleicher, gegen Streptokokken immunisierter Individuen in Fällen von Streptokokken-Sepsis transfundierte. Aber im allgemeinen sind die Transfusionserfolge bei der Sepsisbehandlung ebenso entmutigend gewesen, wie alle anderen therapeutischen Versuche. Wright ging davon aus, nicht gewöhnliches Normalblut zu transfundieren, sondern bei gesunden Menschen durch intravenöse, intramuskuläre oder subkutane Injektion von Staphylo- oder Streptokokken-Vakzine die optimale epiphylaktische Reaktionen zu erzielen; wenn diese eingetreten war — bei intravenöser Injektion nach $^1/_4$ Std., bei subkutaner nach 4—6 Std. — wurde etwa $^1/_2$ l Blut entnommen, defibriniert und sofort dem Patienten intravenös eingespritzt. Es ist klar, daß auch dieses Verfahren keineswegs das Allheilmittel der Sepsis darstellen kann; Versager werden insbesondere dann häufig beobachtet, wenn im Körper noch Herde vorhanden sind, in denen die Streptokokken wuchern, und von wo sie immer erneut in die Blutbahn vordringen können. Immerhin hat er bei einer Reihe prognostisch höchst ungünstiger Fälle von subakuter und chronischer Strepto- und Staphylokokken-Sepsis durch das Verfahren der Immunotransfusion Günstiges erzielt.

Unsere Versuche.

Wir haben uns im ersten Teil unserer Versuche, der jetzt vorgelegt wird, mit der Nachprüfung und weiteren Ausarbeitung der epiphylaktischen Reaktion beschäftigt. Uns interessierte insbesondere die Frage, ob die unspezifischen Reizstoffe, die heute so viel in der Therapie angewendet werden, eine epiphylaktische Reaktion hervorrufen, und in wie weit diese gemessen werden kann. War das der Fall, so durfte man annehmen, daß diese epiphylaktische Reaktion nicht nur einen Maßstab, sondern wahrscheinlich auch eine Erklärung für die Wirksamkeit der in Rede stehenden Stoffe für die Therapie bietet.

Die Ausführung der Versuche geschah wie folgt: Das Blut wurde mit Spritze aus der Armvene entnommen, mit sterilem Glasstäbchen defibriniert und zu gleichen Mengen auf verschiedene kleine Röhrchen verteilt, wo es mit fallenden Mengen von Staphylokokken-Vakzine (bei 60° abgetöteten Staphylokokken) versetzt wurde. Zur Kontrolle wurde die gleiche Blutmenge mit steriler Ringerlösung versetzt. Die Röhrchen wurden verschlossen und 1 Std. bei 37° bebrütet. Dann wurden aus jedem Röhrchen 50 cmm des so behandelten Blutes mit 2,5 cmm einer frisch hergestellten Verdünnung lebender Staphylokokkenbouillon in Ringerlösung versetzt, gut durchgemischt und in die Objektträgerkammer einlaufen gelassen. Die Kammer wurde mit Paraffin-Vaseline versiegelt, 1 Tag bei 37° bebrütet und die gewachsenen Staphylokokken-Kolonien gezählt.

Nun hat bereits das unbehandelte Blut eine stark abtötende Wirkung auf Staphylokokken. Dies läßt sich nachweisen, indem man gleichzeitig die Staphylokokkenaufschwemmung entweder in verflüssigten Agar ausgießt, oder nach der soeben beschriebenen Technik in der Objektträgerkammer mit Blut vermischt, dessen bakterizide Kraft durch Verdünnung mit destilliertem Wasser oder Saponinlösung aufgehoben wurde. Aber durch Beimpfung des Blutes mit geeigneten Mengen abgetöteter Staphylokokken wird diese bakterizide Wirkung wesentlich gesteigert. — Gleichzeitig wurde von den mit Vakzine

vorbehandelten Blutproben die opsonische Kraft bestimmt: Zu dem Zweck wurde ein Teil des Inhalts von jedem der vakzinierten Röhrchen zentrifugiert und das überstehende Serum abgehoben. Zur Leukozytengewinnung wurde unbehandeltes defibriniertes Blut zweimal in Ringerlösung gewaschen. Es wurden nun Gemische hergestellt von je 1 Volumen gewaschener Blutkörperchen, Staphylokokkenaufschwemmung und Serum. Da die Blutkörperchen und Staphylokokken überall die gleichen, und nur die Sera je nach der zur Vakzinierung verwendeten Menge verschieden sind, ergeben sich mehrere solche Gemische. Die Gemische werden 15 Min. bei 37° bebrütet, dann auf Objektträger ausgestrichen, fixiert und gefärbt. Die opsonische Kraft der betreffenden Serumproben ergibt sich aus der Zahl von Staphylokokken, welche 100 Leukozyten durchschnittlich aufgefressen haben.

Tabelle I.
In vitro-Versuch.

Staphylokokkenvakzine.		
Defibr. Blut + tote Staph. 1 Std. 37°	Beimpft mit konst. Zahl lebend. Staph. 24 Std. 37°	Opsonischer Versuch
je 1 ccm Blut	Kolonienzahl	
24 000 Staph.	**9**	365
12 000 „	32	**420**
6 000 „	50	341
3 000 „	27	315
1 500 „	58	305
0 „	37	279
Zahl der eingesäten Kokken	191	

Nach dem Bakterizidieversuch ergab also ein Zusatz von 24 000 toten Staphylokokken pro Kubikzentimeter Blut, nach dem opsonischen Versuch von 12 000 die besten Resultate.

Dann wurde der in vivo-Versuch ausgeführt. Wir haben uns allerdings am Anfang unserer Versuche nicht an die aus dem in vitro-Versuch errechneten optimalen Mengen von Staphylokokkenvakzin gehalten, sondern der Vorsicht halber wesentlich kleinere Mengen eingespritzt, um keine zu starken Allgemeinreaktionen zu erhalten. Verwendet wurde $^1/_2$ Million toter Staphylokokken i. v. Obwohl jede Allgemeinreaktion ausblieb, ist selbst bei dieser kleinen Dosis eine sehr ausgesprochene Beeinflussung sowohl des bakteriziden wie des opsonischen Bluttiters nachweisbar.

Tabelle II.
In vivo-Versuch.

500 000 tote Staphyl. intravenös, Blutentnahme nach 30 Min.

Bakterizidie			Opsonine			
				Blutkörperchen	Serum	
vor	44		1)	vor	vor	641
			2)	vor	nach	739
nach	16		3)	nach	vor	903
			4)	nach	nach	989
Zahl der eingesäten Kokken		138				
Bakterizider Index 44 : 16 = 2,8				Ops. Index (2 : 1)		1,2
				Leuk. Index (3 : 1)		1,4
				Phag. Index (4 : 1)		1,5

Wie ohne weiteres ersichtlich ist, stellt der Quotient der Zahlen in den Präparaten 2 und 1, in denen die gleichen Leukozyten aber verschiedene Sera einwirkten, den „opsonischen“ Index dar; bei dem Quotienten 3:1 handelt es sich um das gleiche Serum, aber verschiedene Leukozyten: er ergibt also die reine Vermehrung der Freßtätigkeit der Leukozyten, den „leukozytischen“ Index; im Quotienten 4:1 wird die ganze phagozytische Wirkung der beiden verschiedenen Blutproben verglichen: dieses Verhältnis wird als der „phagozytische“ Index bezeichnet.

Auch wir haben uns daher von der Richtigkeit der Wrightschen Versuche im allgemeinen überzeugen können. Immerhin ist zuzugeben, daß nicht alle in vitro-Versuche ganz gleichmäßig verlaufen sind: Wir haben zunächst sehr ausgesprochene individuelle Unterschiede zwischen unsern beiden Blutarten gefunden, wobei das Blut von Dr. Meißner im allgemeinen weniger ausgesprochen reagierte; es sei bemerkt, daß sie vor 2 Jahren einen schweren Typhus durchgemacht hat und trotz sonst normalen Befindens eine dauernd niedrige Zahl von Polynukleären im Blut (ca. 47 Proz.) bei einer Gesamtleukozytenzahl von 9500 aufweist. Außerdem sind auch in den in vitro-Versuchen manche störende Unstimmigkeiten vorgekommen, die wir nicht bloß auf unsere Technik zurückführen möchten. Vergleichen wir den sehr ausgesprochenen Verlauf des in vivo-Versuchs, so wird es wahrscheinlich, daß die unzweifelhaft vorhandene Beeinflussung in dem in vivo-Versuch nur zum Teil auf direkte Reizung der Leukozyten des Blutes zurückzuführen ist. Wahrscheinlich spielen die Blutgefäßendothelien hierbei eine sehr wesentliche, vielleicht sogar die Hauptrolle.

Nachdem im Wrightschen Laboratorium bereits Colebrook eine erhebliche Vermehrung der Bakterizidie des lebenden Blutes nach Höhensonnenbestrahlung gefunden hatte, fragten wir uns, ob es möglich wäre, durch die unspezifischen Reizmittel der Protoplasmaaktivierung ähnliche Ergebnisse zu erzielen, und vor allem, ob dabei ein Parallelismus zwischen den in vitro- und den in vivo-Versuchen nachweisbar wäre. Vorversuche ergaben, daß die beiden Präparate in den von uns verwendeten Konzentrationen keine deutlich abtötende oder hemmende Wirkung auf Staphylokokken ausüben. Die Versuche wurden nach genau der gleichen Technik ausgeführt, nur daß das Blut, anstatt mit verschiedenen Mengen toter Staphylokokken, mit fallenden Yatren- oder

Tabelle III.
Yatren – In vitro.

Defibr. Blut + Yatren 1 Std. 37°	Beimpft mit konst. Zahl lebend Staph. 24 Std. 37°	Opsonischer Versuch
Yatrenverdünnung		
1: 500	42	191
1: 1 000	42	204
1: 2 000	86	229
1: 4 000	92	**283**
1: 8 000	**25**	225
1: 16 000	39	246
0	35	215
0	37	205
Zahl der eingesäten Kokken	94	

Aolanverdünnungen in Normosal- oder Ringerlösung vakziniert wurde. Beim Yatren wurde in 8 unter 10 Versuchen am Blut des einen von uns (C. P.) jeweils eine zufriedenstellende Uebereinstimmung zwischen den Ergebnissen der Bakterizidie und des opsonischen Versuchs erzielt. Die optimale Verdünnung lag bei 1:2000 und 1:4000, einmal war sie 1:8000 (s. Tab. III, S. 383).

Bei 4 weiteren Versuchspersonen wurde ebenfalls im in vitro-Versuch eine deutliche, wenn auch nicht immer so ausgesprochene Reaktion mit dem Optimum bei den Verdünnungen 1:4000 bis 1:8000 erzielt. Bei dem Blut von Dr. Meißner dagegen war in 4 Versuchen keine deutliche Beeinflussung nachweisbar.

Zum in vivo-Versuch hätte man nach dem Ergebnis der in vitro-Versuche 1 ccm 5proz. Yatrenlösung einspritzen sollen, doch haben wir uns auf $^1/_4$ dieser Menge beschränkt. Diese Menge lieferte bei dem einen von uns (C. P.) einen sehr ausgesprochenen Anstieg des bakteriziden und phagozytären Vermögens des Blutes, bei Dr. Meißner in teilweiser Uebereinstimmung mit dem negativen Reagenzglasversuch nur eine Vermehrung des phagozytischen Vermögens.

Tabelle IV.
In vivo-Versuch.

0,0125 ccm Yatren intravenös, Blutentnahme nach 30 Min.					
Bakterizidie		Opsonine			
			Blutkörperchen	Serum	
vor	70	1)	vor	vor	76
		2)	vor	nach	91
nach	27	3)	nach	vor	125
		4)	nach	nach	170
Zahl der eingesäten Kokken	234				
Bakterizider Index	2,6	Ops. Index (2:1)			1,2
		Leuk. Index (3:1)			1,6
		Phag. Index (4:1)			2,2

Zu den Aolanversuchen ist zu bemerken, daß die in vitro-Versuche keine ganz eindeutige Bakterizidie- oder Phagozytosebeförderung ergeben haben. Das Optimum der Beeinflussung schien uns jedoch bei 1:800 oder 1:1600 zu liegen. Daraufhin wurde der in vivo-Versuch mit einer dieser Verdünnung entsprechenden Menge ausgeführt. Sie gab einen deutlichen, aber nicht sehr starken Ausschlag; die Bakterizidie war $^1/_2$ Std. nach der Injektion des Aolans fast doppelt so groß, der opsonische Index war etwas verringert, der Phagozytoseindex etwas vermehrt, aber beide waren noch innerhalb der Versuchsfehlergrenzen.

Tabelle V.
In vivo-Versuch.

0,24 ccm Aolan intravenös, Blutentnahme nach 30 Min.					
Bakterizidie		Opsonine			
			Blutkörperchen	Serum	
vor	33	1)	vor	vor	279
		2)	vor	nach	223
nach	18	3)	nach	vor	269
		4)	nach	nach	320
Zahl der eingesäten Kokken	82				
Bakterizider Index	1,8	Ops. Index (2:1)			0,8
		Leuk. Index (3:1)			0,9
		Phag. Index (4:1)			1,1

Da wir annahmen, daß entweder die eingespritzte Aolanmenge oder das Intervall zwischen der Injektion und der Entnahme des Blutes zu klein war, wurde 6 Tage nachher die $1^1/_2$fache Menge Aolan der gleichen Person injiziert und das Blut 1 Std. nachher entnommen. Hierbei ergab sich eine sehr ausgesprochene Beeinflussung.

Tabelle VI.
In vivo-Versuch.

0,4 ccm Aolan intravenös, Blutentnahme nach 60 Min.					
Bakterizidie		Opsonine			
			Blutkörperchen	Serum	
vor	186	1)	vor	vor	237
		2)	vor	nach	316
nach	110	3)	nach	vor	281
		4)	nach	nach	326
Zahl der eingesäten Kokken	347				
Bakterizider Index 1,7			Ops. Index (2 : 1)		1,3
			Leuk. Index (3 : 1)		1,2
			Phag. Index (4 : 1)		1,4

Bei diesem 2. Versuch wurde eine eigenartige, wie wir glauben bisher unbeschriebene, Beobachtung gemacht: Etwa 3 Min. nach der Aolaneinspritzung (0,4 ccm Aolan in 5 ccm Ringerlösnug intravenös[1]) trat ganz plötzlich ein außerordentlich heftiger Kreuzschmerz auf, der aber innerhalb von 5 Min. abgeklungen war. Fieber wurde nicht beobachtet, der Puls blieb langsam, keine Allgemeinerscheinungen. Bei allen anderen Versuchen sind keine Reaktionen nachweisbar gewesen. Auch der Anteil der Leukozyten im Blutbild blieb bei diesem Versuch normal:

	Vor	1 Std. nach
	der Injektion	
polymorphkernige	74 Proz.	71 Proz.
mononukleäre	5 „	9 „
Lymphozyten	20 „	20 „
eosinophile	1 „	—

Zwei Einwände ließen sich gegen die bisher vorgebrachten Ergebnisse erheben: 1) wäre es denkbar, daß die vor der Behandlung entnommenen Blutkörperchen zur Zeit des Ansetzens der Versuche etwas weniger freßtüchtig geworden wären als die 1 Std. später entnommenen; denn man muß bedenken, daß jene Leukozyten 1 Std. länger außerhalb des Körpers im Zimmer gestanden hatten als diese; 2) mußte mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß schon der Eingriff der Entnahme von 5—10 ccm Blut aus der Vene und die intravenöse Injektion der gleichen Menge einer zimmerwarmen isotonischen Lösung diese Erhöhung der Kampfkraft der Leukozyten hätten bewirken können. Beiden Einwänden wurde genügt, indem als letzter Versuch dem Aolanpatienten 5 ccm Blut entnommen und unmittelbar darauf 10 ccm Ringerlösung intravenös injiziert, 30 Min. später erneut eine Blutprobe entnommen wurde: zwischen diesen beiden Blutproben ergaben

1) Aus versuchstechnischen Gründen mußte das Aolan hier — entgegen der üblichen Anwendungsart — intravenös gespritzt werden.

sich nur minimale Unterschiede, die weit innerhalb der Fehlergrenze des Verfahrens liegen.

Tabelle VII.
In vivo-Versuch.

10 ccm Ringerlösung intravenös.					
Bakterizidie		Opsonine			
			Blutkörperchen	Serum	
vor	116	1)	vor	vor	315
		2)	vor	nach	317
nach	121	3)	nach	vor	336
		4)	nach	nach	320
Zahl der eingesäten Kokken	148				
Bakterizider Index 0,96			Ops. Index (2 : 1)		1,01
			Leuk. Index (3 : 1)		1,08
			Phag. Index (4 : 1)		1,02

Der Uebersichtlichkeit halber sind die Ergebnisse der in vivo-Versuche in nachstehender Tabelle VIII kurz zusammengefaßt.

Tabelle VIII.
In vivo-Versuche.

Nach intravenöser Injektion von		Bakterizider Index	Opsonischer Index	Leukozytischer Index	Phagozytischer Index
toten Staphylokokken (500 000)	P.	2,8	1,2	1,4	1,5
Yatren 0,0125	P.	2,6	1,2	1,6	2,2
	M.	0,9	1,3	1,2	1,5
Aolan 0,24	P.	1.8	0,8	0,9	1,1
„ 0,4	P.	1.7	1,3	1,2	1,4
Ringerlösung 10 ccm	P.	0,96	1,01	1,08	1,02

Die Uebersichtstafel zeigt, daß es gelungen ist, sowohl bei spezifischer Vorbehandlung des Menschen mit abgetöteten Staphylokokken wie mit unspezifischer durch Yatren oder Aolan eine sehr ausgesprochene Steigerung des bakteriziden, opsonischen, leukozytischen und phagozytären Vermögens des Blutes hervorzurufen, während die einfache Injektion von Ringerlösung unwirksam war. Die Erhöhung der Kampfkraft des Blutes gegenüber den Staphylokokken trat viel deutlicher in Erscheinung bei dem einen von uns, dessen Blut auch in vitro eine weit bessere Reaktion gezeigt hatte, sie war wesentlich geringer bei Dr. Meißner, deren Blut ja auch in vitro schwächer reagiert hatte. Es scheint aus diesen Versuchen hervorzugehen, daß die spezifische Vorbehandlung durch protoplasmaaktivierende Substanzen sich gerade in einer erhöhten Kampfkraft des Blutes gegenüber eingebrachten Staphylokokken äußert. Wahrscheinlich sind an diesem Kampfe nicht nur die Leukozyten, sondern auch die Kapillarendothelien wesentlich beteiligt. Man darf wohl annehmen, daß das, was wir bei den Staphylokokken gefunden haben, auch für den Abwehrmechanismus des Blutes gegenüber anderen eingedrungenen Mikroorganismen Geltung hat, und daß das Wrightsche Verfahren eine wertvolle Methode zur Schätzung der Abwehrkraft des Blutes darstellt.

Literatur.

1) Aschoff u. Kiyono, Fol. haematol. Vol. 15. 1913. p. 383. — 2) Bieling, R., u. Isaac, Ztschr. für d. ges. exper. Med. Bd. 28. 1922. S. 154. — 3) Bieling, R., Ztschr. f. Immunitätsforsch. Bd. 38. 1923. S. 193. — 4) Colebrook, L., und Storer, E. J., Lancet 1923. Vol. 2. p. 1341. — 5) Dies., Brit. Journ. exp. Path. Vol. 5. 1924. p. 47. — 6) Domagk, G., Habilitationsschr. Greifswald 1924 (erscheint in Virch. Arch.). — 7) Gruber, M., u. Futaki, K., Münch. med. Woch. 1907. S. 249; Dtsch. med. Woch. 1907. S. 1588. — 8) Maximow, Alexander A., Physiolog. Rev. Vol. 4. 1924. p. 535. — 9) Neufeld, F., u. Meyer, H., Ztschr. f. Hyg. Bd. 103. 1924. S. 595. — 10) Neuhaus, C., und Prausnitz, C., Dieses Centralbl. Abt. I. Orig. Bd. 91. 1924. S. 444. — 11) Paetsch. Ibid., Abt. I. Orig. Bd. 60. 1911. S. 255. — 12) Pfeiffer, R., u. Issaff, Ztschr. f. Hyg. Bd. 16. 1894. S. 282. — 13) Pfeiffer, R., und Marx, Ztschr. f. Hyg. Bd. 27. 1898. S. 272. — 14) Pfeiffer, R., u. Bessau, G., Dies. Centralbl. Abt. I. Orig. Bd. 56. 1910. S. 344. — 15) Rautmann, H., Dtsch. med. Woch. 1922. S. 1504. — 16) Schönbauer, L., Wien. klin. Woch. 1924. S. 1131. — 17) Singer, E., u. Adler, H., Ztschr. f. Immunitätsforsch. Bd. 41. 1924. S. 71 u. 468. — 18) Wassermann, A., u. Citron, J., Ztschr. f. Hyg. Bd. 50. 1905. S. 331. — 19) Wright, Sir Almroth E., Technique of the teat and capillary glass tube, 2. edit. London 1921. Eine Uebersetzung der 1. Aufl. ist 1914 erschienen: „Technik von Gummisaugkappe und Glaskapillare“, Verlag G. Fischer, Jena. — 20) Ders., Ann. de l'Inst. Pasteur. T. 37. 1923. p. 107. — 21) Ders., Colebrook, L., u. Storer, E. J., Lancet. 1923. Vol. 24. I.

Untersuchungen über die Frage nach der Flüchtigkeit der Bakteriophagen-Lysine.

[Aus dem Hygiene-Institut (stellv. Direktor: Prof. Dr. C. Prausnitz) der Universität Greifswald.]

Von **Albrecht Gercke.**

Mit 4 Abbildungen im Text.

Die von Olsen und Yasaki 1923 erfolgte Mitteilung, daß nach ihren Versuchen der Bakteriophage sich bei der Vakuumdestillation sowie bei Durchleiten eines Luftstromes durch lysinhaltige Bouillon verflüchtige, ist bereits von mehreren Forschern nachgeprüft worden. Die meisten dieser Autoren haben nur gelegentlich im Destillat geringe Mengen Lysins gefunden, die aber in keinem Verhältnis zum Lysingehalt der Ausgangsbouillon standen; die Mehrzahl der Versuche war überhaupt negativ (Gildemeister und Herzberg, Spät, Borchardt, Meißner, Caplazi, d'Herelle, Biemond, Bronfenbrenner und Korb). Noch ehe die letzten Veröffentlichungen erschienen oder zu meiner Kenntnis gelangt waren, habe ich auf Anregung von Herrn Professor Prausnitz es unternommen, die Frage auch meinerseits in einer größeren Zahl von Versuchen erneut zu prüfen. Offenbar bestehen nach den bisher vorliegenden Arbeiten für die Klärung der Frage nach der Flüchtigkeit der Bakteriophagen folgende Hauptschwierigkeiten:

1. Ihre Wirksamkeit ist so groß, daß Bruchteile eines Milligramms, oft sogar eines Myriagramms genügen, um in einer bakterienhaltigen Bouillon die Lyse in Gang zu bringen. Unterwirft man nun eine lysin-

reiche Bouillon der Destillation, so müssen, wie sich aus den analogen Versuchen Dolds über den Sporentransport durch Dämpfe ergibt, feine Tröpfchen der intakten Flüssigkeit hochgerissen werden. Solche Tröpfchen bleiben, wie wir aus den klassischen Versuchen Flügges wissen, in ruhiger Luft lange Zeit schweben; — um wieviel leichter werden sie durch den scharfen Zug des für die Destillation erforderlichen Vakuums in den Kühler und die Vorlage hineingerissen werden! Es muß sich also zunächst darum handeln, die Bildung und den Uebertritt solcher Tröpfchen nach Möglichkeit zu vermeiden; der 1. Forderung wird durch größte Vorsicht beim Kochen entsprochen, besonders am Anfang der Blasenbildung und unmittelbar vor dem Eintrocknen der kochenden Flüssigkeit. Der 2. Forderung versucht man zu genügen durch Einschaltung eines Reitmairschen Aufsatzes, von mit Perlen gefüllten Röhrchen oder Filtern zwischen Destillationskolben und Kühler.

2. Andererseits besteht die Gefahr, daß etwa flüchtige Lysine auf verschiedene Weise dem Nachweis entgehen können:

a) Selbst bei schonender Destillation im Vakuum bei nicht zu hoher Temperatur ist eine gewisse Hitzeschädigung des Lysins nicht zu vermeiden, wie sich aus allen meinen später angeführten Versuchen ergibt. Dieser Punkt muß bei der Bewertung der Destillationsergebnisse stets berücksichtigt werden.

b) Eine weitere Schädigung besteht darin, daß, wie insbesondere Doerr und Rose gezeigt haben, das Lysin gegen den Aufenthalt in salzfreiem Medium sehr empfindlich ist. Etwaige flüchtige Lysine würden sich aber vom Augenblick des Uebergangs in den gasförmigen Aggregatzustand an unter solchen ungünstigen Bedingungen befinden. Auf diesen schwerwiegenden Einwand habe ich im 1. Teil meiner Untersuchungen besonders geachtet.

c) Wenn die Angabe von Olsen und Yasaki stimmt, so könnten die in der Vorlage etwa kondensierten Lysine durch den scharfen Zug der Vakuumpumpe aus der Vorlage weitergerissen und dem Nachweis entzogen werden. Diesen Einwand suchte d'Herelle dadurch zu entkräften, daß er in einem abgeschlossenen Raum ohne Verwendung der Vakuumpumpe die lysinhaltige Bouillon verdunstete oder verdampfte. Er verwendete einen Kolben (Fig. 1), der mit einfach durchbohrtem Stopfen verschlossen war; durch die Bohrung war mit der Kuppe nach unten ein Reagenzglas geführt, am unteren Ende der Kuppe war ein Glashäkchen angeschmolzen, an dem ein Schiffchen aufgehängt war. Der Kolben, in dessen Boden sich eine geringe Menge lysinhaltiger Bouillon befand, wurde in einem Wasserbad auf 45—55° erhitzt; in einem Teil der Versuche wurde der Kolben vor der Erwärmung durch einen seitlichen Tubus evakuiert; die Innenfläche des Reagenzglases wurde durch eine Eismischung oder fließendes Wasser gekühlt. Hierbei verdunstete oder verdampfte die lysinhaltige Bouillon, die Dämpfe kondensierten sich an der Außenfläche des Reagenzglases und tropften in das Schiffchen hinein. In 12 solchen Versuchen mit verschiedenen Bakteriophagen war der Schiffcheninhalt lysinfrei.

Meine Versuche zerfallen in 3 Abschnitte, sie betreffen 1) den Grad der Schädigung der Lysine bei Aufenthalt im destillierten Wasser, 2) die Frage der Destillierbarkeit der Lysine im Vakuum und 3) Versuche mit dem von d'Hérelle angegebenen Apparat.

In der Tat ist, wie Caplazi mit Recht betont, die Grundlage für eine jede Nachprüfung der Versuche von Olsen und Yasaki eine genaue Kenntnis des Grades der Abschwächung, welchen das Lysin beim Aufenthalt im destillierten Wasser erleidet. Der Nachweis der Flüchtigkeit des Lysins läßt sich einwandfrei nicht durch die „Durchblasversuche“ von Olsen und Yasaki, sondern nur durch die Anordnung der Verdunstung oder der Destillation nach d'Herelle erbringen; aber in beiden Fällen werden die flüchtigen Bestandteile der Bouillon von deren Salzen und Extraktivstoffen getrennt. Falls also die Lysine flüchtig wären, aber durch einen nur kurzen Aufenhalt im destillierten Wasser geschädigt würden, wäre es sehr wohl denkbar, daß das Destillat nur ausnahmsweise lytisch wirksam wäre. Es galt also zunächst diese Vorfrage zu klären.

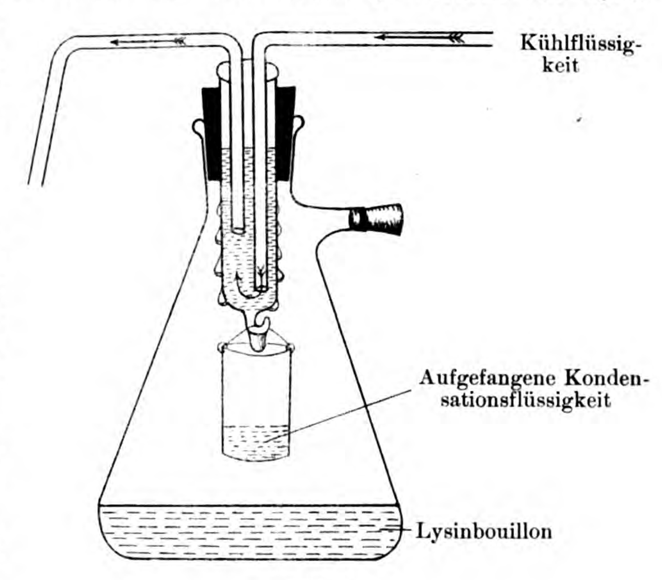


Fig. 1:

I. Versuche über die Schädigung der Lysine durch destilliertes Wasser.

Zu meinen Versuchen dienten 1) der bekannte Shiga-Bakteriophage Lauda G, den das Institut der Liebenswürdigkeit des Herrn Prof. Bail verdankt, 2) der Flexner-Bakteriophage 681, der von Herrn Prof. Carl Prausnitz isoliert wurde. Der Lysinexponent von Lauda-G war in meinen Versuchen $e_L = 10$—11, der von 681 $e_L = 7$—8.

Die Lysine wurden zu jedem Versuche frisch angesetzt und nach 12—24stünd. Bebrütung bei 37° durch Berkefeld-Kerzen filtriert. Von den sterilen Filtraten wurden gleichzeitig Verdünnungen in 1) sterilem, doppelt destilliertem Wasser, 2) 0,85proz. Kochsalzlösung, 3) Bouillon ($p_H = 7{,}4$) angesetzt, und zwar vom Lauda-G eine Verdünnung von 10^{-5} bis 10^{-10}, vom 681 eine Reihe von 10^{-3} bis 10^{-8}, die bei Zimmertemperatur (etwa 20°) im Dunkeln aufgehoben wurden. In verschiedenen Zeitabständen wurden Proben entnommen und sowohl nach der Verdünnungsmethode von Appelmans und Werthemann unter Vermeidung des „Pipetten-Fehlers“ (Doerr), wie auch nach der Plattenausspatelungsmethode von C. Prausnitz auf ihren Lysingehalt geprüft. Bei dem letzteren Verfahren wird 0,1 ccm der auf Bakteriophagen zu prüfenden Verdünnung mit 0,9 ccm einer frisch mit der

sensiblen Bakterienart bis zur schwachen Trübung beimpften Bouillon gemischt und davon sofort 0,1 ccm auf der Oberfläche einer 1proz. Agarplatte ($p_H = 7{,}4$) bis zur Trockne ausgespatelt. Das Ergebnis dieser Versuche ergibt nachstehende Tabelle I.

Tabelle I.

Vers. Nr.	Bakteriophage	Zeitraum (Stunden)	Lysinexponent (Verdünnungsmethode)			Lochzahl (Ausspatelungsmethode)		
			Aq. dest.	NaCl	Bouillon	Aq. dest.	NaCl	Bouillon
1	Lauda-G	0	8	9	9	.	.	.
	desgl.	1	9	10	.	.	.	.
	„	24	8	9	9	.	.	.
2	„	0	9	8	8	.	.	.
	„	1	8	8	.	.	.	.
	„	24	8	8	9	(Hunderttausende)		
3	„	0	8	9	8	80	36	45
	„	24	kein Lysin	7	8	0	30	38
4	„	0	9	8	9	140	160	200
	„	2	8	9	9	70	120	140
	„	8	8	9	8	30	60	80
	„	20	8	8	9	8	6	10
5	„	13	9	8	9	120	110	180
	„	16	9	8	9	90	140	150
	„	19	8	9	9	100	70	100
	„	22	8	9	9	140	210	260
	„	48	8	8	9	80	100	240
						(Tausende)		
6	681	0	7	7	6	480	550	600
	„	24	6	7	7	310	340	420
	„	48	6	7	7	420	480	600

Aus dieser Tabelle ist zu ersehen, daß nur in 1 von 6 Versuchen in 24 Std. der Bakteriophage in destilliertem Wasser unwirksam wurde. Ich möchte annehmen, daß es sich hier um einen Versuchsfehler gehandelt hat, da in allen übrigen Versuchen eine nur geringe Abschwächung, selbst nach 48 Std., festgestellt werden konnte. Es ergibt sich übrigens aus dieser Tabelle, daß die Fehler der Ausspatelungsmethode weit geringer sind als die der Verdünnungsmethode; im übrigen sind die Ergebnisse beider Verfahren durchaus gleichsinnig. Da in meinen nunmehr zu beschreibenden Versuchen das Destillat nur wenige Minuten in salzfreiem Zustande blieb, ist eine Schädigung der etwa abdestillierenden Lysine nicht anzunehmen.

II. Versuche über die Destillierbarkeit.

Ich gebrauchte zu meinen Destillationsversuchen zunächst einen Original Reitmair-Aufsatz, den ich dann durch einen komplizierteren Reitmair ersetzte, um dadurch die Bedingungen für das Ueberspritzen von Lysinteilchen noch weiter herabzumindern. Ich ging auch mit der Temperatur bis auf 59° hinauf, und ließ andererseits das Vakuum bis auf 15 mm absinken.

Ein Einwand, auf den bisher nur einmal hingewiesen wurde, ist der, daß Lysinteilchen durch die Vakuumpumpe abgesaugt werden

können. Diesen Fehler suchte ich dadurch zu umgehen, daß ich das untere Ende des Kondensrohres nicht frei in die Vorlage einmünden ließ, sondern in ein in der Vorlage stehendes Reagenzglas mit 2 ccm 0,85proz. Kochsalzlösung. Der Raum zwischen dem Reagenzglas und dem Vorlagekolben wurde mit Eisstücken ausgefüllt.

Meine Apparatur bestand in Anlehnung an die von Olsen und Yasaki angegebene aus folgenden Teilen (vgl. Fig. 2).

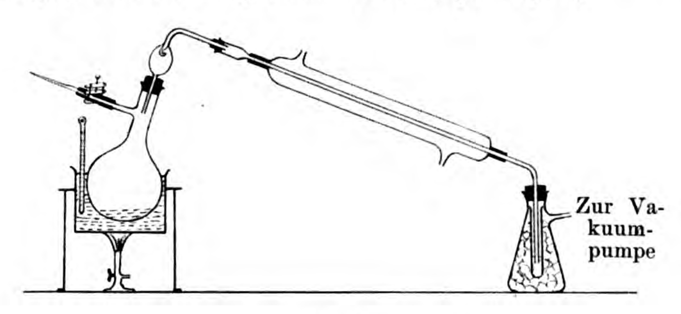


Fig. 2.

1) Ein in einem Wasserbade zu $^2/_3$ eingetauchter Destillationskolben von 1 l Inhalt, von dessen Hals schräg nach oben ein Glasrohr abgeht; am Ende dieses Rohres ist mit Gummischlauch und Klemme eine Kapillare zur Druckregulierung angebracht. Durch die Wahl der Größenverhältnisse des Kolbens (1 l) und der zu destillierenden Lysinmenge (10 ccm) wird die Gefahr des Ueberschäumens beim ersten Aufwallen der siedenden Bouillon und am Schluß der Destillation möglichst verringert.

2) Die Verbindung zu dem Liebigschen schen Kühler wird durch einen Reitmairschen Destillationsaufsatz hergestellt. Ich benutzte anfangs, d. h. bei den unter A aufgeführten Versuchen, den Original-Reitmair, wie er im Lautenschläger-Katalog (Nr. 100, S. 426, Nr. 4373) aufgeführt ist (Fig. 3). Zu den unter B aufgeführten Versuchen nahm ich ein anderes Modell, das durch hakenförmige Endigung des in der Glaskugel enthaltenen Glasrohres den Dampf einen noch größeren Umweg machen läßt, und dadurch die Möglichkeit des Mitreißens von Tröpfchen noch weiter herabsetzt (Fig. 4). Daran schließt sich

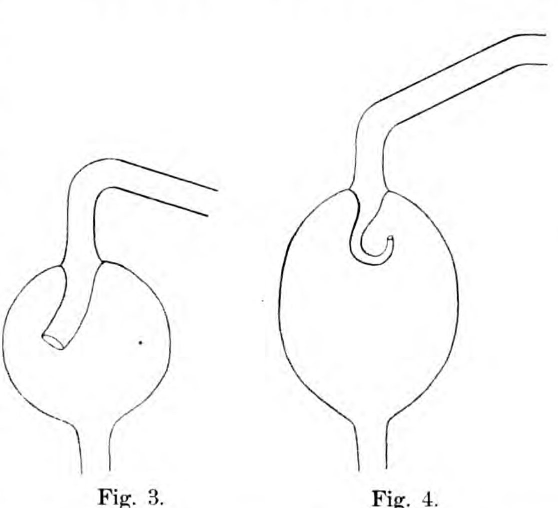


Fig. 3. Fig. 4.

3) ein 0,60 m langer Liebigscher Kühler, und an diesen

4) ein Kniestück, das so lang gewählt war, daß sein Ende bis auf den Grund eines Reagenzglases reichte. Das Reagenzglas wurde mit einem spiralig gebogenen Draht in einer

5) Saugflasche gehalten, die mit Eisstücken gefüllt war. An die Saugflasche schließt sich die Wasserstrahlpumpe mit dazwischen geschaltetem Hg-Manometer an. Um dem Vorwurf, daß durch zu hohen Druck der Pumpe Lysine abgesaugt werden könnten, zu begegnen, wurden in das Reagenzglas zunächst 2 ccm Nährbouillon getan. Bei der Einschaltung des Vakuums zeigte sich aber, daß die Bouillon außerordentlich stark schäumte: An ihrer Stelle wurde deshalb 0,85proz. sterile Kochsalzlösung verwandt. Dadurch wurde erreicht, daß der Wasserdampf, der sich zum Teil in dem Liebig-Kühler schon wieder kondensiert hatte, durch die Vorlage hindurchperlen und etwa in ihm mitgeführte Lysine in der Kochsalzlösung festgehalten werden mußten.

Die Versuche wurden zunächst mit dem Bakteriophagen 681 ausgeführt, der zwischen 12 und 24 Std. alt war, und vorher entweder $^1/_2$ Std. auf 56° erhitzt, oder durch eine Berkefeld-Kerze filtriert war, um ihn von lebenden Flexner-Bazillen zu befreien. Von den Versuchen A (mit dem Original-Reitmair) wurden 5 ausgeführt. Ich lasse zunächst das Protokoll eines solchen Versuches folgen:

Versuchsprotokoll.

Im Kolben 10 ccm Bakteriophage 681, im Reagenzglase der Vorlage 2 ccm NaCl.

5^{10} Beginn des Versuches.

5^{14} Das Manometer zeigt einen Druck von 20 mm Hg an. Temperatur des Wasserbades 53°. Aufkochen.

5^{30} Druck 15 mm, Temperatur 56°. Kurze Unterbrechungen im Kochen.

5^{36} Druck 15 mm, Temperatur 56°. Kurzes Aufwallen, danach Blasenbildung in dem zur Trockne eingedampften „Rückstand".

bis 5^{41} nach Oeffnung der Kapillare Durchsaugen von Luft.

Der „Rückstand" wird mit 10 ccm destillierten Wassers auf sein ursprüngliches Volumen aufgefüllt, der Liebig-Kühler wird mit 10 ccm Nährbouillon durchgespült („Spülflüssigkeit"), um etwa nicht bis in die Vorlage gelangte Lysine nachweisen zu können. Das Destillat wird als solches verwendet. Die Titration des Lysins erfolgt nach Appelmans und Werthemann. Es ergab sich als Lysinexponent für

Bakteriophage vor dem Versuch	6
Rückstand	5
Spülflüssigkeit	keine Lysine
Destillat	desgl.

Die Ergebnisse der beiden Versuchsreihen sind in den Tabellen II bis IV (S. 393 u. 394) zusammengefaßt.

Bei der Destillation ist in allen Fällen eine mehr oder weniger starke Abschwächung des der Destillation unterworfenen Lysins erfolgt: Verringerung auf $^1/_{10}$ 3mal, $^1/_{100}$ 9mal, $^1/_{1000}$ 4mal, $^1/_{10000}$ 3mal, $^1/_{100000}$ 1mal. In der Spülflüssigkeit wurden in 3 von 20 Versuchen geringe Lysinmengen (2 mal nur in der konzentrierten Flüssigkeit, 1mal in der zehnfach verdünnten, nie in höheren Verdünnungen) nachgewiesen. Das Destillat enthielt in 5 von 20 Versuchen Lysin und zwar: In der Reihe A (mit dem Original-Reitmair) 1mal $^1/_{10000}$, 1mal $^1/_{10000000}$ des Originalbakteriophagen; in der Reihe B (mit dem komplizierten Reitmair) 1mal $^1/_{100}$ Millionen und 2mal $^1/_1$ Milliarde des Originalbakteriophagen.

Berücksichtigt man diese Zahlen, so ist es ohne weiteres klar, daß es sich bei diesen Ergebnissen nur um gelegentliche Verunreinigungen handeln kann, die durch das Verspritzen feinster Tröpfchen bedingt

Tabelle II.

A. (Originalreitmair). Ruhrbakteriophage 681.

Lfde. Nr.	Dauer der Destill. in Min.	Temperatur	Vakuum	Bemerkungen über das Kochen	Titration			
					unbeh. Bakterioph.	Destillat.	Spülflüssigkeit	Rückstand
1	60	Gleichm. steigend von 46 bis 55°	Gleichm. fallend von 90—30 mm Hg	Kocht die letzten 15 Min. mit Unterbrechung	10^{-9}	10^{-4}	0	10^{-4}
2	77	Gleichm. steigend von 48 bis 59°	Konstant um 70 mm	Kocht die letzten 30 Min. mit Unterbrechung	10^{-6}	0	0	10^{-4}
3	120	Konstant um 49,5°	Konstant um 60 mm	Kocht nur vereinzelt auf	10^{-6}	0	0	10^{-4}
4	20	Schnell steigend von 49,5—53°	Schnell fallend von 60—30 mm	Kocht ohne Unterbrechung 8 Min.	10^{-8}	10^{-1}	0	10^{-4}
5	20	Schnell steigend von 51—57°	Schnell fallend von 70—20 mm	Kocht ohne Unterbrechung 5 Min.	10^{-9}	0	0	10^{-5}

Tabelle III.

B. (Komplizierter Reitmair). Ruhrbakteriophage 681.

Lfde. Nr.	Dauer der Destill. in Min.	Temperatur	Vakuum	Bemerkungen über das Kochen	Titration			
					unbeh. Bakterioph.	Destillat.	Spülflüssigkeit	Rückstand
6	20	Gleichm. steigend von 49—60°	Gleichm. fallend von 50—30 mm	Kocht mit Unterbrechung	10^{-7}	0	0	10^{-5}
7	72	Schwankend zwischen 56—64°	Konstant um 60 mm	desgl.	10^{-4}	0	0	10^{-2}
8	72	Konstant um 49°	Konstant um 35 mm	Kocht nicht	10^{-6}	0	0	10^{-5}
9	31	Steigend von 53—56°	Schnell fallend bis 15 mm	Seltenes Kochen	10^{-6}	0	0	10^{-5}
10	438	Konstant um 49°	Konstant um 80 mm	Kocht nicht, keine Destill. bis zum Trocknen	10^{-6}	0	0	10^{-4}
11	20	Konstant um 50°	Konstant um 15 mm	Kurzes Kochen am Schluß, 2 Min.	10^{-6}	0	0	10^{-4}
12	18	Konstant um 53°	Schnell fallend bis 15 mm	Kocht mit Unterbrechung 6 Min.	10^{-3}	0	0	10^{-1}
13	15	Konstant um 56°	desgl.	Kocht ohne Unterbrechung 5 Min.	10^{-3}	0	0	10^{-1}

Bei Nr. 12 und 13 hatte die Bouillon nur eine $p_H = 6,9$.

Tabelle IV.

B. (Komplizierter Reitmair). Bakteriophage Lauda-G.

Lfde. Nr.	Dauer der Destill. in Min.	Temperatur	Vakuum	Bemerkungen über das Kochen	Titration			
					unbeh. Bakteriophl.	Destillat.	Spülflüssigkeit	Rückstand
14	18	Konstant um 50°	Schnell fallend bis 15 mm	Kocht mit Unterbrechung	10^{-10}	0	0	10^{-7}
15	27	Konstant um 53°	Schnell fallend bis 20 mm	desgl.	10^{-9}	0	0	10^{-7}
16	20	Konstant um 56°	Schnell fallend bis 15 mm	Kocht z. Schluß ohne Unterbrechung (5 Min.)	10^{-11}	0	0	10^{-10}
17	20	Konstant um 59°	Langsam fallend bis 20 mm	desgl. (4 Min.)	10^{-10}	0	0	10^{-6}
18	28	desgl.	Schnell fallend bis 15 mm	desgl. (5 Min.)	10^{-9}	10^{-1}	10^{-0}	10^{-6}
19	19	desgl.	desgl.	desgl. (4 Min.)	10^{-10}	10^{-1}	10^{-1}	10^{-7}
20	20	desgl.	desgl.	Kocht ununterbrochen (7 Min.)	10^{-10}	10^{-1}	10^{-0}	10^{-7}

sind. Wenn auch durch die Apparatur die Gefahr möglichst verringert wurde, daß solche Tröpfchen in den Kühler und die Vorlage gelangten, so läßt sich das bei dem außerordentlich hohen Zug des Vakuums nicht mit absoluter Sicherheit vermeiden. Eine Schädigung des Lysins bei der Destillation kann nicht in nennenswertem Maße erfolgt sein: Die Versuche der Reihe I haben gezeigt, daß selbst ein mehrstündiger Aufenthalt im destillierten Wasser nur eine geringfügige Schädigung bedingt, während hier das Destillat nur in den wenigen Minuten des Aufenthaltes im Kühler salzfrei war; andererseits kann eine erhebliche Schädigung durch die erhöhte Temperatur nicht stattgefunden haben, da selbst der längere Zeit erhitzte Bakteriophagenrückstand im Destillationskolben wenigstens einen Teil seiner Wirksamkeit behalten hat, das Destillat aber fast sofort im Liebigschen Kühler abgekühlt wird. Dem Einwand, daß die flüchtigen Lysine durch die Wasserstrahlpumpe abgesaugt würden, und dadurch dem Nachweis entgangen wären, wird nach Möglichkeit dadurch begegnet, daß das Kühlerrohr unter die Oberfläche von physiologischer Kochsalzlösung geleitet wurde. Hiergegen, und deshalb gegen diese ganzen Versuche würde schließlich nur noch der letzte Einwand von Olsen und Yasaki bestehen bleiben, daß man beim Durchleiten von Luft durch lysinhaltige Kochsalzlösung das Lysin entfernen könnte; aber auch diese Verfasser konnten ein solches (nach unseren bisherigen Erfahrungen wenig wahrscheinliches) Ergebnis nur erzielen, wenn die betreffende Flüssigkeit auf 37° erhitzt, nicht wenn sie, wie in meinen Versuchen, eisgekühlt war. Um jedoch auch diesem letzten Bedenken entgegenzutreten, wurde eine weitere Versuchsreihe mit dem oben angegebenen Apparat von d'Herelle ausgeführt.

III. Versuchsreihe.

Diese Versuche wurden genau entsprechend den oben beschriebenen Angaben von d'Herelle ausgeführt; verwendet wurde ein 850 ccm fassender Kolben, in dessen Boden etwa 10 ccm Lysinbouillon eingeführt wurden. Dabei wurde jegliches Verspritzen und Benetzen der Kolbenwand sorgfältigst vermieden, dadurch daß die Bouillon ohne Berührung von Kolbenhals und -Wandung mit einer Pipette auf den Kolbengrund einlaufen gelassen wurde. Das Auffangegefäß für die kondensierte Flüssigkeit wurde vor dem Versuch mit 5 ccm Bouillon beschickt, die Erwärmung des Kolbens erfolgte durch Einstellen in ein Wasserbad, das in den verschiedenen Versuchen auf Temperaturen zwischen 47° und 61° erwärmt wurde; die Kühlung geschah durch fließendes Leitungswasser (etwa 8°). Die Ergebnisse der nach dieser Methode angeführten Versuche sind in Tab. V zusammengestellt.

Tabelle V.

Lfde. Nr.	Dauer der Verdunstung in Min.	Temperatur	Bemerkungen	Titration		
				unbeh. Bakteriophag.	Kondensflüssigkeit	Rückstand
1	420	Zwischen 47° und 51°	.	10^{-11}	0	10^{-8}
2a	300	Zwischen 56° und 59°	Nach 5 Std. Entnahme des Schiffchens und Einhängen eines zweiten	10^{-10}	0	10^{-5} (2a und 2b)
2b	135	desgl.	Titration nach 24 Std.	10^{-10}	10^{-4}	
3	130	Zwischen 58° und 59°	.	10^{-10}	0	10^{-6}
4a	60	Zwischen 58° und 61°	Nach 1 Std. Entnahme des Schiffchens und Einhängen eines zweiten	10^{-10}	0	10^{-5} (4a und 4b)
4b	160	desgl.	.	10^{-10}	10^{-3}	
5	150	Zwischen 55° und 59°	.	10^{-10}	0	10^{-4}
6	80	Konstant auf 59°	.	10^{-9}	0	10^{-8}
7	65	desgl.	.	10^{-9}	0	10^{-9}

Bei Nr. 2b und 4b dürften Verunreinigungen des Flaschenhalses bei der Herausnahme des 1. Schälchens durch von unten gespritzte Lysinbouillon stattgefunden haben.

In den ersten 2 Versuchen wurde bis zur Trockne eingedunstet, in den folgenden beschränkte ich mich auf die Gewinnung von etwa 5 ccm Kondensationsflüssigkeit. Auch in diesen Versuchen wurde mit einer Ausnahme eine z. T. erhebliche Abschwächung der Wirksamkeit der lysinhaltigen Bouillon festgestellt (je 1mal auf $^1/_{10}$, $^1/_{1000}$, $^1/_{10000}$ und $^1/_{1000000}$, 2mal auf $^1/_{100000}$. In 2 Versuchen (Nr. 2

und 4) wurde der Kondensationsprozeß unterbrochen, um in der Mitte des Versuches den Inhalt des Schiffchens zu prüfen. Das Schiffchen wurde entfernt und durch ein anderes steriles Schiffchen, das ebenfalls mit steriler Bouillon beschickt war, ersetzt. Beide Male war die 1. Probe lysinfrei, während die 2. Probe einen deutlichen Lysingehalt aufwies. Ein Vergleich zwischen diesen Versuchen 2b und 4b und den übrigen Versuchen ergibt, daß diese Ergebnisse nicht durch eine, nur unter ganz bestimmten äußeren Bedingungen auftretende Flüchtigkeit des Lysins zu erklären sind; denn in den unter ganz entsprechenden Bedingungen ausgeführten Parallelversuchen blieb der Schiffcheninhalt lysinfrei. Die Erklärung ist offensichtlich die folgende: Bei dem Abnehmen des auf dem Kolben festsitzenden Stopfens ist eine kräftige Erschütterung des Kolbeninhaltes und eine Benetzung der Kolbenwandung nicht vermieden worden; dadurch kamen Teile der lysinhaltigen Bouillon auch mit den höheren Teilen der Kolbenwandung in Berührung und wurden durch das nachfolgende Kondenswasser in das Schiffchen hineingespült. Außerdem waren die Schiffchen so breit, daß sie beim Einführen und Herausnehmen den Kolbenhals berührten und dadurch ebenfalls verunreinigt werden konnten. In sämtlichen anderen Versuchen, wo diese Fehlerquelle vermieden wurde, blieb der Schiffcheninhalt lysinfrei.

Zum Schlusse möchte ich Herrn Prof. Carl Prausnitz und Frl. Dr. Gertrud Meißner für ihre liebenswürdige Hilfe bei der Anfertigung meiner Arbeit aufrichtigen Dank aussprechen.

Zusammenfassung.

1. Bei Zimmertemperatur im Dunkeln fand in einem von 7 Versuchen nur eine geringfügige Abschwächung der mit doppelt destilliertem Wasser 1000 bzw. 10000000fach verdünnten Bakteriophagen statt. Diese Fehlerquelle kann also negative Ergebnisse bei der Destillation des Lysins nicht erklären. — 2. Bei 20 Vakuumdestillationsversuchen mit dem Reitmairschen Aufsatz und Auffangung des Destillationsproduktes unter physiologischer Kochsalzlösung wurde nur 3mal im Kühler und 5mal in der Vorlage ein geringer, in allen übrigen Versuchen kein Lysingehalt nachgewiesen. Der Inhalt des Destillationskolbens wies allerdings regelmäßig eine erhebliche Abschwächung seines Lysingehaltes auf, die aber nicht entfernt ausreichte, um diese negativen Ergebnisse zu erklären. — 3. Mit der von d'Herelle angegebenen Apparatur, bei der ohne Verwendung des Vakuums nur die verdunstende Flüssigkeit kondensiert wurde, wurden neun Versuche ausgeführt: in zwei Fällen, wo offensichtlich Versuchsfehler vorlagen, enthielt die kondensierte Flüssigkeit geringe Lysinmengen; in den übrigen Versuchen war sie lysinfrei. — 4. Die geschilderten Versuche haben daher keinen Anhalt dafür ergeben, daß die Bakteriophagen flüchtig sind.

Literaturverzeichnis.

Appelmans, R., Compt. rend. Soc. Biol. T. 86. 1922. S. 508. — Biemond, A. G., jr., Ztschr. f. Hyg. Bd. 103. 1924. S. 681. — Borchardt, W., Klin. Woch. 1924. S. 278. — Bronfenbrenner, J., a. Korb, Ch., Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med. Vol. 21. 1924. p. 177; Ref.: Centralbl. f. d. ges. Hyg. Bd. 7. 1924. S. 499. — Caplazi, A., Ztschr. f. Hyg. Bd. 102. 1924. S. 438. — Doerr, R., u. Rose, G., Schweiz. med. Woch. Bd. 54. 1924. S. 10. — Dold, H., Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 84. 1920. S. 558. — Gildemeister, E., u. Herzberg, K., ibid., Abt. I. Orig. Bd. 91. 1924. S. 228. — Dies., Klin. Woch. 1924. S. 186 u. 278. — d'Herelle, F., Compt. rend. Soc. Biol. T. 90. 1924. p. 27. — Meißner, G., Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 92. 1924. S. 424. — Olsen, O., u. Yasaki, Y., Klin. Woch. 1923. S. 1879. — Dies., Ibid. 1924. S. 278 u. 279. — Dies., Ztschr. f. Hyg. Bd. 102. 1924. S. 540. — Prausnitz, C., Centralblatt f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 89. 1923. S. 187. — Ders., u. Firle, E., Ebenda. Bd. 93. 1924. S. 148. — Spät, W., Med. Klin. 1924. S. 184. — Werthemann, A., Arch. f. Hyg. Bd. 91. 1922. S. 255. — Yasaki, Y., Ztschr. f. Hyg. Bd. 102. 1924. S. 554. — Zdansky, E., Wien. klin. Woch. Bd. 37. 1924. S. 141.

Ueber die färberische Unterscheidung der Bakterien vermittels der Viktoriablau-Pyroninmethode[1]).

Von **Josef Schumacher**, Berlin.

Mit 1 Tafel.

Die hier zu schildernde Methode entstand in den Zeiten der Inflation, wo das teure, zur Gramschen Färbung erforderliche Jod eine nicht unwesentliche Belastung des Etats der Institute und Laboratorien bedeutete. Mein Bestreben war damals darauf gerichtet, einmal das freie Jod als solches bei der Gramschen Färbung auszuschalten und durch Verwendung hochkonzentrierter, das Jod gebunden enthaltender Lösungen in einer Küvette[2]) auch möglichst eine Ersparnis zu erzielen. Das gelang auf folgende Weise unter Verwendung von Quecksilberjodidjodkalium und Phosphinalkohol zur Entfärbung, wodurch diese rascher erfolgt, als bei Anwendung gewöhnlichen absoluten Alkohols.

An Lösungen waren hierzu erforderlich:

1) Karbolgentianaviolettlösung. Man vermischt gleiche Teile 2proz. wässeriger Lösung von Gentianaviolett mit 4proz. Karbolwasser.

2) Quecksilberjodidjodkalium (1,3 g Sublimat werden in 100 ccm Wasser gelöst und 5 g Jodkalium hinzugegeben).

3) Phosphinalkohol. Man löst 0,2 g Phosphin[3]) = Chrysanilin extra (nicht Phosphin 3 R) in 100 ccm absolutem Alkohol.

---

1) Vortrag, gehalten nebst Demonstrationen auf der 9. Tagung der Fr. Verein. f. Mikrobiologie, Würzburg 1922. Vorläufige kurze Zusammenfassung Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 89. S. 207. Aus äußeren Gründen kann die ausführliche Arbeit erst heute publiziert werden.

2) Da die Lösungen hierbei nicht mit Farbstoff verunreinigt und daher längere Zeit gebraucht werden könnten, andernfalls die höhere Jodkonzentration naturgemäß ein Nachteil gewesen wäre.

3) Bei Kahlbaum, Adlershof, erhältlich.

Technik:

Die Präparate kommen:

1) in die kalte Karbolgentianaviolettlösung auf 30 Sekunden,

2) in das Quecksilberjodidjodkalium ebenso lange,

3) in Phosphinalkohol, in welchem sie so lange hin und her bewegt werden, bis keine Farbe mehr abgeht, wozu meist 15—30 Sek. genügen,

4) nach Abspülen mit Wasser wird mit einer 1proz. Safraninlösung 10 Sek. lang nachgefärbt.

(Zwischen jeder Prozedur werden die Präparate gründlich mit Wasser abgespült.)

Die grampositiven Bakterien sind bei dieser Methode rein tiefviolett, nicht schwarzviolett, wie bei der Original-Gramschen Methode gefärbt, die gramnegativen safraninrot. Gegenüber der Original-Gramschen Färbung war hiermit die Färbedauer auf ungefähr die Hälfte verkürzt.

Da mir aber in jener Zeit sehr viel daran lag, die Methode auch zu einer billigeren wie die Original-Gramsche Methode zu machen, dehnte ich meine Versuche weiter aus, indem ich versuchte, ob die Methode auch noch mit einer wesentlich dünneren Lösung von Quecksilberjodidjodkalium zum Ziel führt, was der Fall ist. Auch wenn gar nur 0,5 g $HgCl_2$ in 300 ccm heißem Wasser gelöst werden und man nur 1,5 g Jodkalium hinzugibt, erhält man noch dieselben Resultate.

Ferner lag mir daran, bei der Gramschen Färbung nicht nur das freie Jod auszuschalten, sondern möglichst unter Verwendung des Viktoriablaus auch noch zu besseren Kontrasten zu gelangen, zumal ich inzwischen die guten Eigenschaften des Viktoriablaus durch eingehenden Gebrauch desselben kennen gelernt hatte. Es ist in der bakteriologischen Technik ja schon lange bekannt, seiner Einbürgerung in die tägliche Praxis des Bakteriologen und Praktikers standen aber bisher Hindernisse entgegen, die zu beseitigen mir damals, wie ich glaube, gelungen ist. Einmal löst sich nämlich der Farbstoff bekanntlich relativ schwer in Wasser, seine Lösungen sind wenig beständig, flocken bei weiterer Verdünnung mit Wasser aus und bei seiner Anwendung zum Färben von Tuberkelbazillen entflammen sich die Lösungen, da zur bisher üblichen Bereitung der Viktoriablaulösungen relativ viel Alkohol erforderlich war. Das waren im wesentlichen die Gründe, warum alle Bakteriologen das Viktoriablau wieder verlassen haben. Die Beseitigung der Ausflockung bei weiterem Verdünnen mit Wasser, die Haltbarmachung der wässerigen Lösungen und das Vermeiden der Entflammbarkeit, wenn man die Lösung auch zum Färben der Tuberkelbazillen und der Spirochäten verwendet, wozu das Viktoriablau noch geeigneter ist als das Fuchsin seiner größeren Lipoidlöslichkeit wegen, gelang mit Hilfe von Glyzerinwasser.

Wir halten uns im Laboratorium eine Viktoriablaustammlösung vorrätig, die wir in der Weise herstellen, daß wir 2 g Viktoriablau B (Kahlbaum) in 50 ccm Alkohol über Nacht lösen und alsdann 50 ccm 4proz. Karbolwasser hinzugeben. Zur Herstellung der gebrauchsfertigen Lösung[1]), die sich in meinem Laboratorium jetzt seit über 2 Jahren in weißer Flasche aufbewahrt unverändert gehalten hat, ver-

1) die auch bei Dr. Karl Hollborn, Leipzig, Kronprinzenstraße 71, unter der Bezeichnung „Glyzerinviktoriablau" vorrätig ist.

dünnt man 5 ccm dieser Stammlösung mit 45 ccm 10proz. Glyzerinwasser.

An Stelle der Gramschen Färbung verwenden wir daher jetzt aus den oben erörterten Gründen in unserem Laboratorium die

Viktoriablau-Quecksilberjodidjodkalium-Pyronin-Methode.

Technik:

1) Färbung der hitzefixierten Ausstriche mit kalter Glyzerinviktoriablaulösung 1 Min.

2) Nach Abspülen mit Wasser Einstellen der Präparate 30 Sek. lang in Quecksilberjodidjodkalium (Rezept anfangs der Arbeit in Absatz 2).

3) Nach Abspülen mit Wasser Differenzieren in Chininalkohol 1:100.

4) Nach Abspülen mit Wasser Nachfärbung mit 1proz. Pyronin 20 Sek. lang.

Resultat: Positiv sich färbende Bakterien erscheinen tief reinblau, die negativen rein pyroninrot, wodurch besonders schöne Kontraste resultieren, auf die ich besonderen Wert legte (Abb. 1).

Damit war ich aber damals noch nicht zufrieden und bestrebt, das Jod völlig auszuschalten, was auch nach einigem Bemühen gelang.

Werden Bakterienausstriche zuerst mit Viktoriablau gefärbt, dann mit Phosphinalkohol differenziert und mit Pyronin nachgefärbt, so ist ein Teil der Bakterien noch blau, ein Teil rot gefärbt. Die Methode konnte noch keine elegante genannt werden. Das Viktoriablau haftete offenbar an den positiven Bakterien noch etwas zu schlecht. Diesem Uebelstände half ich durch vorherige Beizung mit Tannin ab, worauf die Resultate gute waren. Die zu untersuchenden hitzefixierten Objektträgerausstriche werden demnach, wie folgt, behandelt:

Technik der Tannin-Viktoriablau-Pyronin-Methode.

1) Tannin 25proz. kalt 1 Min.

2) Erhitzen mit der gebrauchsfertigen Glyzerin-Viktoriablaulösung bis gerade zum Aufkochen, Einwirkungsdauer der Farblösung alsdann noch 30 Sek.

3) Einstellen in Phosphinalkohol 1:500 (Rezept anfangs der Arbeit in Absatz 2), bis keine blaue Farbe mehr abgeht, wozu bei Hin- und Herbewegen der Präparate je nach deren Dicke $^1/_2$—1 Min. erforderlich ist. Die Verwendung gut, dünn und gleichmäßig ausgestrichener Präparate ist nach Möglichkeit zu empfehlen.

4) Nachfärben mit 1proz. Pyronin oder Safranin 10—15 Sek. lang. Pyronin gibt die besten Kontraste.

Der Reinheit des zu erhaltenden Bildes wegen wird zwischen jeder Prozedur mit Wasser abgespült.

Resultat: Wie bei der Viktoriablau-Quecksilberjodidjodkalium-Pyroninmethode (Abb. 2).

Soweit die Nachprüfung bis jetzt ergab, scheint eine Uebereinstimmung mit der Gramschen Methode zu bestehen, jedoch sieht man in vielen größeren Bakterien mehr Details als bei der Gramschen Färbung. Die Verschiedenheit der Färbung beruht darauf, daß die einzelnen Lipoidsäuren der Bakterienlipoproteide chemisch verschieden zusammengesetzt sind[1]). Auf die in meiner 1. kurzen Mitteilung ge-

1) Bei meinem damaligen Vortrag waren uns weder die Lipoproteide als Ursache der Gramschen Färbung bekannt, noch die entsprechenden dazugehörigen Lipoidsäuren isoliert, die wir jetzt für die Hefe als Hg-Salz dargestellt haben.

machten Angaben bezüglich Verwendung von Aethyl- und Malachitgrün komme ich später noch ausführlich zurück.

Erklärung der Tafelabbildungen.

Das in Abbildung 1 dargestellte Bild von gonorrhoischem Eiter, das ebensogut mit der Tannin-Viktoriablau-Pyroninmethode zu gewinnen ist, ist nach der Viktoriablau-Quecksilberjodidjodkalium-Pyroninmethode gewonnen.

Gonokokken rot, andere Bakterien blau.

Abb. 2 zeigt einen nach der Tannin-Viktoriablaumethode gefärbten Ausstrich (Zahnbelag) mit Safraninnachfärbung.

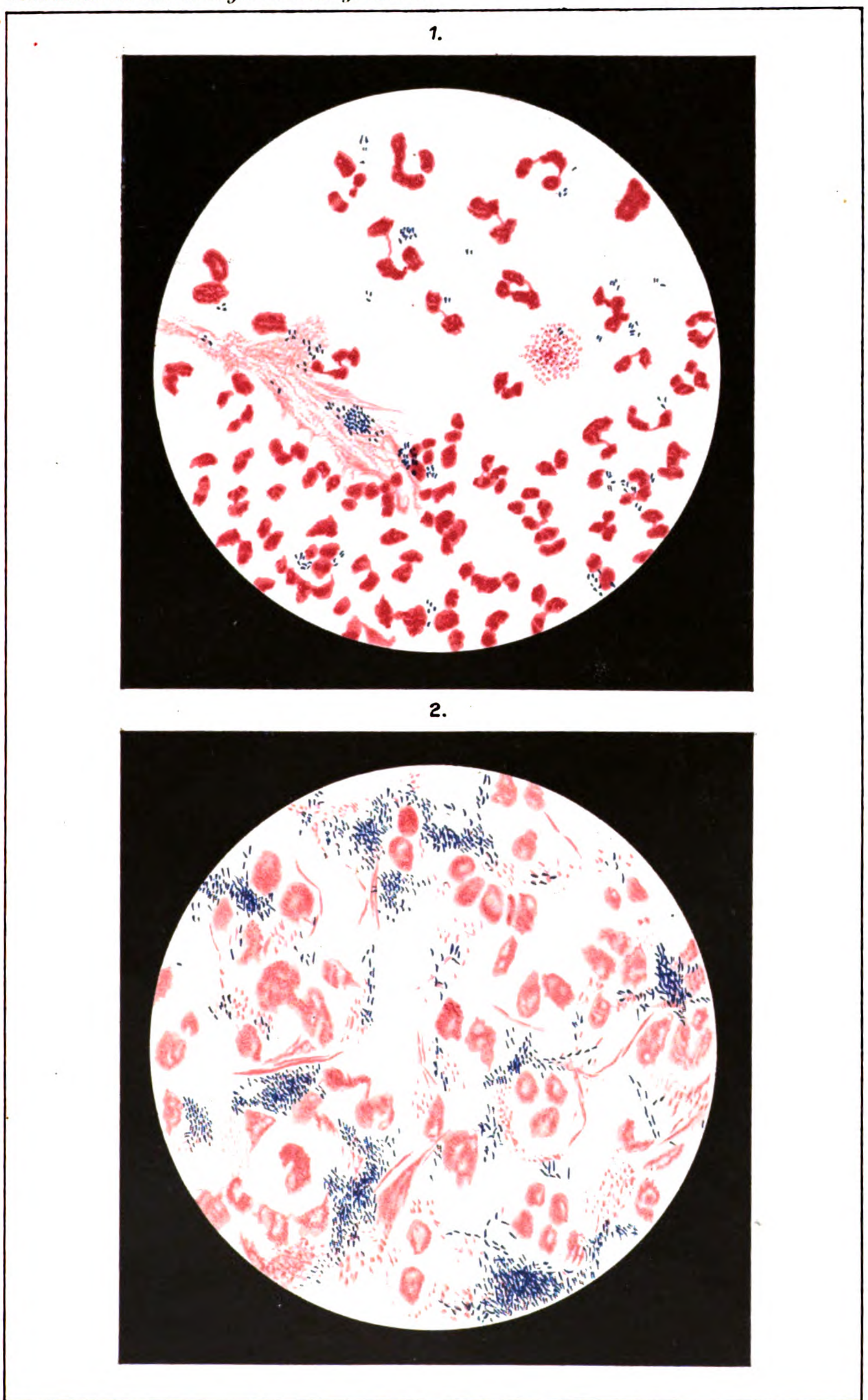
Literatur.

1) Schumacher, Ueber die färberische Darstellung der Lipoide. (Dermat. Woch. Bd. 79. 1924. Nr. 45.) — 2) Ders, Ueber die färberische Darstellung der verschiedenen Zellinhaltsstoffe. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. [im Erscheinen].) — 3) Ders., Ueber das Verhalten einiger basischer Farbstoffe zu Lipoiden. (Biochemische Ztschr. 1925.) — 4) Ders., Zur Gramschen Färbung. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 93. S. 266.) — 5) Ders., Ueber eine neue Schnellfärbung der Spirochaeta pallida mit Viktoriablau. (Dermat. Woch. Bd. 79. 1924. Nr. 47.) — 6) Ders., Die Prozesse der Zellfärbung. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 89. S. 207.)

Ferner war uns damals noch unbekannt, daß das Viktoriablau der ausgezeichnetste Lipoidfärber ist, wovon wir uns inzwischen zuerst histochemisch (1), alsdann auch makrochemisch (3) überzeugt haben. Die damaligen Befunde waren im Gegensatz zu denen meiner zuletzt publizierten Arbeiten noch auf rein empirischem Wege gefunden worden.

Inhalt.

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena — 5298.



Verlag von Gustav Fischer in Jena.

Lith. Anst. v. E. Giltsch, Jena.



Centralbl. f. Bakt. etc. I. Abt. Originale. Bd. 94. Heft 7/8.

Ausgegeben am 1. Mai 1925.

Ueber die Leistungsfähigkeit des direkten Züchtungsverfahrens der Tuberkelbazillen nach Löwenstein-Sumyoshi.

[Aus dem Bakteriologischen Institut der königl. ung. Pázmány Péter-Universität zu Budapest (Direktor Prof. Dr. Hugo Preisz).]

Von Dr. **L. Surányi** und **J. Putnoky**.

In der ärztlichen Literatur der letzten Jahre fällt die enorme Zahl der die Tuberkulosefrage behandelnden Artikel auf. Diese Volksseuche hat nämlich durch die Kriegsverhältnisse an Umfang und Malignität derart zugenommen, daß das unermüdliche Bestreben der Aerzte, die bisherigen theoretischen und klinischen Methoden zu verfeinern, deren Lücken mit neuen Methoden auszufüllen, wohl begreiflich ist. Durch diese strebsame Arbeit sind wir tatsächlich in den Besitz einer Reihe verschiedener Proben gelangt, welche zwar auf verschiedenen Wegen, wie durch Agglutination (Fornet-Christhensen), Präzipitation (Bonacorsi), Komplementablenkung (Besredka, Bouquet-Nègre, v. Wassermann), ferner durch die Kolloidlabilität der tuberkulösen Blutsera (v. Darányi, v. Gerlócy, Mátéffy, Mündel) und die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit, jedoch alle mit mehr oder weniger Erfolg, zur Bestimmung der Aktivität der Tuberkulose dienen sollen. Es gibt auch Methoden, bei denen die auf verschiedene Weise hergestellten Antigenfraktionen sowohl in diagnostischer, wie auch in therapeutischer Hinsicht Verwendung finden. Daß aber mit den erwähnten Methoden noch immer nur einzelne Forscher arbeiten, könnte man damit erklären, daß man sich hütet, bei den heutigen schweren finanziellen Verhältnissen meistens fabrikmäßig hergestellte, teuere Präparate zu beschaffen, bevor deren Brauchbarkeit für klinische Zwecke einwandfrei bewiesen ist. Solche Beweise könnten aber nur dann erhalten werden, wenn es möglich wäre, die Reaktionen auf einer breiten Basis zu prüfen. Dies wieder wäre nur dann möglich, wenn jeder Forscher imstande wäre, die Präparate selbst herzustellen. Da zur Herstellung der meisten Präparate geeignete Kulturen des Tuberkelbazillus notwendig sind, diese aber meistens nur sehr spärlich und nur in Laboratorien vorhanden waren, die Reinzüchtung wieder eine mühsame und nicht sicher zum Ziele führende Arbeit ist, so halten wir es für genügend begründet, daß die Methoden nicht Gemeingut der Aerzte geworden sind.

Dieser Uebelstand wird unseres Erachtens durch das von Löwenstein und Sumyoshi angegebene Züchtungsverfahren mit einem Schlage beseitigt. Die beiden Autoren haben die Tuberkelbazillen direkt aus dem Untersuchungsmaterial durch Anwendung von verschieden verdünnten Säuren und Laugen herauszuzüchten vermocht.

In unseren Vorversuchen haben wir verschiedene Verdünnungen von Salzsäure, Schwefelsäure und Natronlauge verwendet und fanden,

daß eine 25proz. Salz- oder Schwefelsäure zur Gewinnung von Reinkulturen geeignet sind.

Als Untersuchungsmaterial wählten wir den am leichtesten verfügbaren Auswurf. Ein Teil des Sputums wird mit der 5fachen Menge einer 25proz. Schwefel- oder Salzsäure vermischt und nach 10, 15, 20, 30 und 40 Min. langem Stehen bei Zimmertemperatur vom Gemisch ein Teil mit einer 3—5fachen Menge physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt, rasch zentrifugiert und das Sediment noch 2mal mit Kochsalzlösung gewaschen. Mit dem Sedimente wurden dann ausschließlich Eiernährboden beimpft und die Röhrchen mit Paraffin verschlossen bis zu 4 Wochen in den Brutschrank gestellt.

Wir untersuchten 150 Sputa auf diese Weise, doch mußten wir 21 hiervon aus äußeren Gründen ausschalten, so daß die Gesamtzahl der bis zu Ende geprüften Fälle sich auf 129 beläuft. Die Sputa wurden nach den üblichen Färbungs- und Anreicherungsverfahren mikroskopisch auf Tuberkelbazillen untersucht und wurden 74 positiv, 55 dagegen negativ befunden. Von den 74 positiven Sputa haben wir 59mal, also fast in 80 Proz. (79,7 Proz.) Reinkulturen erhalten. Von den untersuchten positiven Sputa wurden 52 mit Schwefelsäure, 22 mit Salzsäure behandelt. Von den mit Schwefelsäure behandelten Sputa erhielten wir Reinkulturen in 76,9 Proz., von den mit Salzsäure behandelten in 95,6 Proz. der Fälle.

Ziehen wir die Einwirkungsdauer der Säuren und den Prozentsatz der auf diese Weise erhaltenen Reinkulturen in Betracht, so finden wir, daß es ein Optimum gibt, über welches hinaus der Prozentsatz der betreffenden Kulturen sowohl bei Anwendung von Salzsäure, wie auch von Schwefelsäure allmählich abnimmt. Dieses Optimum beträgt 15 Min.

Mit 25proz. Schwefelsäure behandelte Sputa:

Dauer der Einwirkung in Min.	10	15	20	30	40
Reinkulturen in Proz.:	72,4	84,6	66,6	66,6	38,3

Mit 25proz. Salzsäure behandelte Sputa:

Dauer der Einwirkung in Min.	10	15	20	30	40
Reinkulturen in Proz.	87,5	100,0	71,42	57,1	45,4

Von den 55 mikroskopisch negativ befundenen Auswürfen haben wir 11mal (20 Proz.) ebenfalls Reinkulturen erhalten.

Während unserer Versuche haben wir folgende Beobachtungen gemacht: 1. Das Erscheinen der Kolonien erfolgte bei den einzelnen Stämmen sehr verschieden, bei etlichen schon nach 10—12tägiger Bebrütung, hingegen gab es Stämme, die erst in der 4. Woche sichtbare Kolonien bildeten. 2. Farbe, Ausbreitungsvermögen sowie Konsistenz der einzelnen Kolonien, auch in ein und derselben Kultur, weisen oft sehr große Differenzen auf. 3. Je länger die Säurebehandlung dauerte, um so geringer war die Anzahl der erhaltenen Kolonien. 4. Im Sediment der mit Säure behandelten Sputa fanden wir bedeutend weniger säurefesten Stäbchen, als in der unbehandelten. Auch kam es öfters vor, daß säurefeste Stäbchen im Sediment überhaupt nicht nachzuweisen waren, obwohl daraus eine Kultur entstand.

Auf Grund der erwähnten Ergebnisse halten wir die Behandlung des Untersuchungsmateriales mit 25proz. Salzsäure, bei einer Einwirkungsdauer von 15 Min. am geeignetsten für die Erhaltung von Reinkulturen der Tuberkelbazillen.

Aus finanziellen Gründen war es uns nicht möglich, unsere Züchtungsversuche mit Tierversuchen zu verbinden; folglich sind wir nicht in der Lage, uns über den Wert der beiden Methoden aus eigenen Erfahrungen äußern zu können. Nach Angaben von Löwenstein und Sumyoshi ist das Züchtungsverfahren nicht nur ebenbürtig mit dem Tierversuche, sondern ihm überlegen.

In Anbetracht dieser Versuchsergebnisse glauben wir, daß die direkte Züchtungsmethode berufen ist, die kostspieligen, umständlichen und nicht immer mit Sicherheit zum Ziele führenden Tierveruche nicht nur zu ersetzen, sondern auch ganz zu verdrängen. Nebst diesen Vorteilen stehen uns zur Durchführung der verschiedenen diagnostischen und therapeutischen Methoden zahlreiche geeignete Stämme zur Verfügung, ferner sind wir in der Lage, unser Wissen über kulturelle Eigenschaften der Tuberkelbazillen an einem großen Material zu revidieren und um neue Erfahrungen zu bereichern. Auch für die Autovakzinebehandlung sind die Wege eröffnet und wir hegen die Hoffnung, daß durch die Säuremethode die Züchtung der Tuberkelbazillen auch aus dem Blute gelingen wird.

Ueber das Wachstum menschlicher und tierischer Streptokokken im frischen defibrinierten Menschen- und Tierblut, sowie experimentelle Virulenzsteigerungsversuche mit Streptokokken durch Züchtung in faulenden Geweben.

[Aus dem Bakteriologischen Laboratorium der Bakteriologischen Abteilung des Reichsgesundheitsamts.]

Von Dr. **Rudolf Bumm.**

Die Frage der Virulenzbestimmung der Streptokokken beschäftigt die Wissenschaft bereits seit vielen Jahren. Zahlreiche Methoden, welche die Lösung dieser Aufgabe bringen sollten, sind im Laufe der Jahre bekanntgegeben worden, doch immer wieder ergaben Nachprüfungen, daß dieses Ziel nicht erreicht worden war. Neuerdings ist nun von Ruge und Philipp (1—4) eine Virulenzbestimmungsmethode für Streptokokken angegeben worden, deren gute Brauchbarkeit und Zuverlässigkeit bereits von verschiedenen Seiten Bestätigung gefunden hat (5—8), so daß das Problem, zum mindesten für die Klinik, gelöst zu sein scheint.

Die Beurteilung der Virulenz der Streptokokken nach Ruge und Philipp beruht bekanntlich auf der unterschiedlichen Wachstumsfähigkeit der Streptokokken im frischen defibrinierten Blute des erkrankten Menschen. Virulente Streptokokken zeigen in dem defibrinierten Blute innerhalb von 4 Std. eine deutliche Vermehrung, avirulente Streptokokken eine Abnahme innerhalb der angegebenen Zeit. Zahlreiche Untersuchungen am Krankenbett haben die Gesetzmäßigkeit dieses Verhaltens bestätigt.

Nachdem sich die Virulenzbestimmungsmethode nach Ruge und Philipp bewährt hat, lag es nahe, sie auch im Laboratoriumsversuch

zur Klärung verschiedener Fragen heranzuziehen. Die Methode gibt uns die Möglichkeit, über die Virulenz von Tierstreptokokken beim Menschen Untersuchungen anzustellen, die unter Umgehung des Versuches in vivo Schlüsse zu ziehen gestatten. Ferner erlaubt sie uns, das Verhalten von Menschen- und Tierstreptokokken im Tierblut zu studieren und die Frage zu prüfen, ob die in der Humanmedizin bewährte Methode auch in der Veterinärmedizin praktisch Verwendung finden kann.

Ueber beide Fragen habe ich eingehende Untersuchungen angestellt, bei denen ich allerdings aus naheliegenden Gründen von der von Ruge und Philipp für ihre Virulenzbestimmungsmethode gegebenen Vorschrift abweichen mußte. Während Ruge und Philipp ihre Probe mit dem Blute kranker Individuen ausführten, in deren Organismen die zu beurteilenden Krankheitserreger vorhanden waren, mußte ich mich darauf beschränken, das Blut gesunder Individuen — Menschen und Tiere — zu verwenden und die zu prüfenden Streptokokken der Blutprobe aus der künstlich gezüchteten Kultur zuzusetzen. Es muß daher zunächst erörtert werden, ob unter diesen veränderten Versuchsbedingungen die Bewertung der Ergebnisse die gleiche sein darf wie bei der Ruge-Philippschen Originalmethode. Ueber die Bedeutung des Patientenblutes für die Virulenzprobe sind nun von Philipp selbst und von Lehmann (9) Kontrolluntersuchungen ausgeführt worden, die ergeben haben, daß ein entscheidender Unterschied in der Wirksamkeit von Eigen- und fremdem Blut nicht nachweisbar ist. Es ist somit eine Beeinträchtigung des Resultates durch die Verwendung von Blutproben gesunder Individuen nicht zu befürchten. Was nun die Verwendung von künstlich gezüchteten Mikroorganismen bei meinen Versuchen anlangt, so wissen wir, daß Streptokokken bei der in der üblichen Weise erfolgenden künstlichen Züchtung kaum eine Virulenzsteigerung, sondern im allgemeinen eine wenn auch in ihrer Intensität oft schwankende Virulenzabnahme aufzuweisen pflegen. Wenn wir diesen Faktor bei den Ergebnissen meiner Versuche, über die ich in dem Abschnitt I dieser Arbeit berichten werde, berücksichtigen, dann ergibt sich, daß die Anzahl der positiven Ausschläge eher als zu gering anzusehen ist als zu hoch.

Ebenso wie die Bestimmung der Virulenz der Streptokokken interessiert das Problem der experimentellen Virulenzsteigerung der Streptokokken sowohl die Klinik wie die experimentell arbeitende Wissenschaft in hohem Maße. Nach einer im Anfang vorigen Jahres erschienenen Arbeit von H. Küstner (10) soll eine Virulenzsteigerung der Streptokokken durch Züchtung derselben in faulenden Geweben möglich sein. Es schien mir zweckmäßig, eine Nachprüfung dieser Befunde meinen erstgenannten Versuchen anzuschließen, weil im Bestätigungsfalle versucht werden konnte, eine Virulenzsteigerung von im Menschenblut avirulenten Tierstreptokokken herbeizuführen. Das Ergebnis meiner Untersuchungen über diese Frage findet sich im Teil II meiner Arbeit.

I[1].

Die zu meinen Versuchen verwendeten Streptokokkenstämme setzen sich wie folgt zusammen:

---

1) Ueber das Ergebnis dieser Versuche ist von Herrn Prof. Gildemeister auf der Tagung der Deutschen Vereinigung für Mikrobiologie in Göttingen (Juni

1. 4 hämolytische Menschenstreptokokkenstämme — frisch isoliert aus dem Vaginalsekret vom Portiokarzinomfällen der Universitätsfrauenklinik in Berlin mit mittellangen bis langen Ketten, die mit dem für Streptokokken typischen flockigen Bodensatz in Bouillon wuchsen. — 2. 2 grüne Menschenstreptokokken — seit Jahren in der Sammlung der bakteriologischen Abteilung des Reichsgesundheitsamts fortgezüchtet — mit Diplokokken und kurzen Kettenformen, welche mit geringem Bodensatz und starker Trübung der Bouillon wuchsen und auf Blutagar die typischen grünlichen Kolonien des Streptococcus viridans bildeten. 3. 5 hämolytische, frisch aus dem Tierkörper isolierte Drusestreptokokken — aus dem Hygienischen Institut der Tierärztlichen Hochschule in Hannover (Professor Miessner) —, die Pferdeserumbouillon leicht trübten und mit einem beträchtlichen flockigen Bodensatze wuchsen. — 4. 1 hämolytischer Drusestreptokokkus — aus dem Hygienischen Institut der Tierärztlichen Hochschule in Berlin (Geh. Rat Frosch). — 5. 1 in seiner näheren Herkunft unbekannter Pferdestreptokokkus „Hans" — Sammlung des Heeresveterinäruntersuchungsamts (Professor Lührs) —, 4) und 5) mit dem Wachstum der Drusestreptokokken, nur mit stärkerer Trübung der Bouillon. — 6. 1 aus einem Pferdeabszeß gezüchteter, anhämolytischer grüner Streptokokkus vom Viridanstyp; — 7. 3 anhämolytische Rindermastitititisstämme vom Typ und Wachstum des Streptococcus viridans aus dem Hygienischen Institut der Tierärztlichen Hochschule in Leipzig (Obermedizinalrat Professor Dr. Klimmer). — 8. 1 hämolytischer Kaninchenstreptokokkus. — 9. 1 hämolytischer Hundestreptokokkus. Letztere beide aus der Sammlung des Heeresveterinäruntersuchungsamtes (Prof. Lührs), im Aussehen und Wachstum ähnlich den Drusestreptokokken.

Die hämolytischen Menschenstreptokokken, alle Drusestreptokokken, der Hunde- und Kaninchenstreptokokkus töteten weiße Mäuse innerhalb 24 Std. nach intraperitonealer Injektion von 0,5 ccm Bouillonkultur; die grünen Menschen- und Tierstreptokokken sowie der Pferdestreptokokkus „Hans" bewirkten bei Mäusen in der angegebenen Dosis keine tödliche Infektion.

Die Virulenzprüfung der 19 Streptokokkenstämme erfolgte in frischem defibrinierten Menschen-, Pferde-, Esel-, Rinder-, Kälber-, Hammel-, Hunde- und Kaninchenblut, und zwar wurde das Wachstum der Keime darin nach der Rugeschen Virulenzprobe und dem Philippschen Plattengußverfahren derart beurteilt, daß sofort nach der Beimpfung des Blutes und 4 Std. danach — in dieser Zeit wurden die Blutröhrchen im Brutschrank bei 37° aufbewahrt — je $1^1/_2$ ccm Blut mit 10 ccm Agar zu Blutplatten gegossen wurden. Die Blutagarplatten wurden 48 Std. in den Brutschrank bei 37° C gestellt, die gewachsenen Kolonien sodann ausgezählt und aus der Differenz der beiden Platten das Verhalten der Keime im Blut beurteilt. Hatten sich die Streptokokken im Blut während des 4stünd. Brutschrankaufenthaltes vermehrt, so mußten entsprechend mehr Kolonien auf der 2. Platte gewachsen sein als auf der 1., im anderen Falle umgekehrt. Es wurden zu den Untersuchungen stets 24stünd. Aszites- bzw. Serum-Bouillonkulturen verwendet.

Die Prüfung der obengenannten Stämme auf ihr Wachstum im Menschenblut, aus dem wir nach Ruge und Philipp auf ihre Virulenz für den menschlichen Organismus schließen können, zeitigte nachstehende Ergebnisse. Da stets Blut aus der Nabelschnur von gesunden Neugeborenen genommen wurde und es sich also nicht um Patientenblut handelt, lassen sich Rückschlüsse nur im allgemeinen auf gesunde menschliche Organismen ziehen (s. Tabelle).

1924) kurz berichtet worden (vgl. Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 93. 1924. S. 45*).

Stamm	Menschenblut	Eselblut	Pferdeblut	Rinderblut	Kälberblut	Hammelblut	Hundeblut	Kaninch.-blut
Str. Schrock	– – – –	++++	++++	– – – –	±?	++++	– – – –	++++
	– – –	.	+	.	.	.	– – – –	–
	– – – –	.	++++	.	.	– – – –	– – – –	– – – –
	– – – –	.	++++	.	.	.	.	++++
„ Ruwald	++++	++++	.	–	– – –	–	– – – –	++++
	– – – –	.	.	.	.	– –	.	++++
	+	++++	.	.	.	– –	– – – –	++++
	– – – –	.	.	.	.	– – – –	.	++++
„ Beyer	– – – –	++++	++++	–	–	– – –	.	.
	– –	++	++++	.	–	– –	– – – –	+++
	– – – –	.	++++	.	.	– – – –	– – – –	+++
	– – – –	++++	++++	.	.	– -	.	+++
„ Rybanik	– – – –	++++	+++	+	++++	– – – –	– – – –	++++
	– – – –	++++	– –	.	– –	– – –	.	–
	.	+	±?	.	+	.	– – – –	++++
	.	.	.	.	.	.	.	++++
„ Fischer	– – – –	.	– – – –	– –	– – –	– – – –	– – – –	– – – –
	– – – –	.	– – –	–	.	– – – –	.	.
	– –	.	– – –	.	.	– – –	– – – –	.
	.	.	– – –	.	.	.	.	.
	.	.	–	.	.	.	.	.
„ Siebers	– – – –	–	±?	–	–	– – – –	– – – –	– – – –
	– – – –	– –	.	.	.	.	– – – –	– – – –
„ Druse I	– – – –	++++	++++	++++	++++	++++	– – – –	++++
	– – – –	++++	++++	+++	++++	++++	– – – –	++++
	– – – –	++++	++++	.	.	.	.	.
	–	++++	++++	.	.	.	.	.
	.	.	++	.	.	.	.	.
„ „ II	– – – –	++++	++++	++++	++++	++++	– – – –	++++
	– – – –	+	++++	+++	++++	+	– – – –	++++
	– –	++++	++	.	.	++++	.	.
	.	++++	++	.	.	+	.	.
	.	.	+	.	.	.	.	.
	.	.	+	.	.	.	.	.
„ „ III	– –	++++	++++	++++	++++	++++	– – – –	++++
	– – – –	++++	.	.	.	++++	– – – –	++++
	– – – –	++++	.	.	.	:	.	.
„ „ IV	– – – –	++++	.	.	.	++++	.	++++
	.	.	.	.	.	++++	.	.
„ „ V	– – – –	++++	.	.	.	++++	.	.
	– – – –	++++	.	.	.	++++	.	.
„ „ B	– – – –	++++	++	++	++++	– – – –	– – – –	++++
	– – – –	++++	++++	–	.	.	– – – –	++++
	– – – –	.	++	.	.	.	.	.
	– – – –	.	.	.	.	.	.	.
„ Eiter Pferd	– – – –	– – – –	++	– – – –	– – – –	– – – –	– – – –	– – –
	– – – –	– – – –	– – – –	.	.	– – – –	– – – –	– – – –
	– – – –	.	– –	.	.	.	.	.
	– – – –	.	– – – –	.	.	.	.	.
„ Pferd „Hans“	– – – –	++++	++++	– – –	++++	– – – –	– – – –	++++
	– – – –	.	++++	– – –	.	– – – –	– – – –	++++
	+++	.	.	.	.	.	– – – –	.
	+	.	.	.	.	.	.	.
	– – – –	.	.	.	.	.	.	.
	– – – –	.	.	.	.	.	.	.

Stamm	Menschenblut	Eselblut	Pferdeblut	Rinderblut	Kälberblut	Hammelblut	Hundeblut	Kaninch.-blut
Str. Kaninchen	— — — —	++++	.	++++	++++	++++	— — — —	++++
	—	++++	.	++++	.	++++	— — — —	++++
	— — — —	++++	.	.	.	.	— — — —	+++
„ Hund	++++	++++	.	++++	++++	++++	++++	++++
	+	— —	.	.	.	++++	+++	++++
	— — — —	—	.	.	.	.	++++	++++
	++	.	.	.	.	.	+++	++++
	.	.	.	.	.	.	+++	.
„ Mastitis Vi	—	++	+	±?	±?	+	— — — —	+
	— — —	++	—	— — —	— — — —	— — — —	— — — —	++
	.	—	±?	.	.	±?	.	.
	.	— —	.	.	.	— — — —	.	.
	.	.	.	.	.	— —	.	.
„ „ V_4	— — — —	— —	—	—	—	—	— — — —	— —
	— — — —	— — — —	—	— — — —	— — — —	++++	— — — —	— —
	.	—	—	.	.	— — — —	— — — —	— — — —
	.	.	.	.	.	— — — —	— — — —	.
	.	.	.	.	.	—	.	.
„ „ V_{50}	— — — —	—	.	— — — —	— — — —	++++	.	.

In der Tabelle geben die vertikalen Reihen die Anzahl der ausgeführten Untersuchungen an, die horizontalen den Ausfall. Es bedeutet + einfache Vermehrung innerhalb 4 Std., ++ doppelte, +++ dreifache, ++++ vierfache Vermehrung und mehr innerhalb 4 Std. Die Minuszeichen zeigen ebenso Verminderung innerhalb 4 Std. an.

Von den menschlichen Streptokokken zeigte nur der Streptococcus Ruwald sofort nach der Züchtung aus dem Vaginalsekret einer Frau mit Portiokarzinom eine deutliche Vermehrung im Menschenblut und war danach als menschenvirulent anzusehen. Nach fortgesetzter Weiterzüchtung auf künstlichem Nährboden wurde er ebenso avirulent, wie es alle anderen von mir geprüften Menschenstreptokokken von Beginn an waren. Nur einmal war noch ein Umschlag des Streptococcus Ruwald in Virulenz aus unbekannten Gründen zu verzeichnen. Mehrere andere menschliche virulente Streptokokken verloren alsbald die Fähigkeit, auf künstlichen Nährböden weiterzuwachsen und sind, weil nicht alle Untersuchungen mit ihnen durchgeführt werden konnten, in der Tabelle nicht berücksichtigt. Die Tierstreptokokken, von denen uns die Drusestämme 1—5 und die Rindermastitisstämme als frisch tiervirulent zugesandt worden waren, erwiesen sich bis auf den schon seit Jahren auf künstlichen Nährböden fortgezüchteten Pferdestreptokokkus „Hans" und den Hundestreptokokkus sämtlich avirulent, d. h. sie wurden vom Menschenblut stets einwandfrei entweder vollständig vernichtet, oder doch in ihrem Wachstum deutlich gehemmt. Der Pferdestreptokokkus „Hans" zeigte kein gleichmäßiges Verhalten: 2mal vermehrte er sich in 4 Std. im Blut deutlich, 5mal wurde er von demselben abgetötet oder vermindert. Auch der Hundestreptokokkus ließ 3mal eine beträchtliche Vermehrung nach 4stünd. Bebrütung erkennen, während er 1mal von den Abwehrstoffen des Blutes überwunden wurde. Zusammenfassend läßt sich somit sagen, daß die benutzten Tierstreptokokken in ihrer Mehrzahl nach Ruge-Philipp avirulent für den Menschen waren, doch ist diese Beobachtung nicht durchgängig; es ist daher die Möglichkeit einer menschlichen Infektion mit Tier-

streptokokken nicht von der Hand zu weisen. Bei der verhältnismäßig geringen Anzahl von Untersuchungen, die ich durchführen konnte, erscheint mir indes eine endgültige Beantwortung dieser Frage noch nicht möglich; immerhin regen meine Ergebnisse zu weiterer Nachprüfung an, zumal ich in der Literatur außer einer Arbeit von G. Seiffert (11), in der er über bakterizide und entwicklungshemmende Substanzen von Menschen- und verschiedenen Tierseren gegenüber Tier- und Menschenstreptokokken berichtet, ohne jedoch zu einem für unsere Frage entscheidenden Schlusse zu gelangen, bisher keine Angaben für oder wider die Möglichkeit einer menschlichen Infektion mit Tierstreptokokken finden konnte.

Das Verhalten der untersuchten Streptokokkenstämme im Pferde- und Eselblut ist, entsprechend der nahen Verwandtschaft dieser beiden Tierarten, übereinstimmend und kann daher zusammen besprochen werden. Die Drusestämme und der Pferdestreptokokkus „Hans", die hämolytischen Menschenstreptokokken, mit Ausnahme des Streptokokkus Rybanik, und der Kaninchenstreptokokkus zeigten durchgehend eine sehr starke Vermehrung im Pferde- und Eselblut, die grünen Menschenstreptokokken und die Mastititisstreptokokken, der grüne Pferdeeiterstreptokokkus und der Hundestreptokokkus verhielten sich ungleichmäßig oder nahmen an Zahl bei der 4stünd. Bebrütung ab. Der Drusestamm II zeigte im Laufe der sich über 4 Monate hinziehenden Untersuchungen eine leichte Abnahme seiner Wachstumsfähigkeit, obwohl er im Sinne von Ruge und Philipp immer noch als virulent zu gelten hatte, worauf ich später noch zurückkommen werde.

Für die Untersuchung des Wachstums der Streptokokken im Rinder- und Kälberblut stand mir als Blutspender nur je ein Rind und ein Kalb zur Verfügung. Im Gegensatz zu den vorhergehenden Untersuchungen, bei denen bei jedem Versuch das Blut eines anderen Tieres Verwendung finden konnte, mußte hier das Blut derselben Tiere mehrere Male verwendet werden, worauf bei der späteren Bewertung entsprechend Rücksicht zu nehmen ist. Auch im Rinderblut wiesen die Drusestreptokokken, der Hunde- und der Kaninchenstreptokokkus eine starke Vermehrungsfähigkeit auf, während die Menschenstreptokokken bis auf den ungleich wachsenden Streptococcus Rybanik sämtlich abgetötet wurden. Die Rindermastitisstämme und der grüne Pferdeeiterstreptokokkus zeigten gleichfalls keine Vermehrung, während der Pferdestreptokokkus „Hans" ungleiches Wachstum erkennen ließ.

Im Hammelblut waren wieder die Drusestämme, der Hunde- und der Kaninchenstamm sehr wachstumsfähig, die Mastitisstämme und der hämolytische Menschenstreptokokkus Schrock verhielten sich ungleichmäßig, die anderen Menschenstämme und die übrigen Pferdestämme wurden am Wachstum deutlich gehindert.

Im Hundeblut erfuhren alle Stämme bis auf den Hundestreptokokkus eine fast völlige Vernichtung, dieser jedoch vermehrte sich in dem gleichartigen Blute sehr erheblich.

Die Untersuchungen im Kaninchenblut endlich zeigten eine starke Wachstumsabnahme der grünen Menschenstreptokokken, des grünen Pferdeeiterstammes und des grünen Mastitisstammes V_4, während der Menschenstreptococcus Schrock in den einzelnen Blutproben verschieden wuchs. Alle anderen Stämme waren durchgängig sehr vermehrungsfähig.

Ueberblicken wir die Virulenzbestimmungsversuche in Tierblutproben, so ergibt sich folgendes: Drusestreptokokken haben im Pferde- und Eselsblut, aber auch im Rinder-, Hammel- und Kaninchenblut starke Vermehrung gezeigt. Soweit aus der Literatur hervorgeht, sind Infektionen mit Drusestreptokokken bisher nur bei Pferden, Eseln, Maultieren und Mauleseln beobachtet worden, dagegen nicht bei anderen Tieren. Experimentell lassen sich jedoch bei Mäusen und Kaninchen pathogene Wirkungen durch Drusestreptokokken erzielen. Bei Rindern und Hammeln sind, soweit ich die Literatur übersehe, derartige Infektionsversuche bisher nicht gemacht worden. Nach den Virulenzbestimmungsversuchen wäre anzunehmen, daß sie zu einem positiven Ergebnisse führen würden. Auf alle Fälle berechtigen meine Versuchsergebnisse zu der Forderung, die Ruge-Philippsche Virulenzprobe bei der Druse der Pferde an klinischem Material zu studieren. Von Interesse ist auch die Beobachtung, daß der Drusestamm II im Laufe der Untersuchungen eine Abnahme seiner Wachstumsfähigkeit von einer 4fachen bis auf die doppelte Vermehrung innerhalb von 4 Std. zeigte, was für eine allmähliche Abnahme seiner Virulenz durch die dauernde Fortzüchtung auf künstlichem Nährboden sprechen könnte.

Die Rindermastitisstämme konnten sich in den verschiedenen Blutproben im allgemeinen nicht vermehren. Ihr Absterben bzw. ihre Wachstumsabnahme im Rinder- und Kälberblut nimmt bei dem rein lokalen Charakter dieser Erkrankung kein Wunder, da wir ja auch beim Menschen ungefährliche Infektionen mit Streptokokken kennen, die ein negatives Ergebnis bei der Virulenzprobe zeigen. Es entsprach deshalb auch unseren Erwartungen, daß die Rindermastitisstämme auch in den anderen Tierblutproben eine deutliche Verminderung oder Abtötung erfuhren. Ueber Infektionsversuche mit Rindermastitisstreptokokken konnte ich in der Literatur nichts finden. Der Stamm V_1 zeigte im allgemeinen eine größere Wachstumsfähigkeit als der Stamm V_4, es legt infolgedessen die Vermutung einer verschiedenen Virulenz nahe. Der Stamm V_{50} endlich ließ sich auf künstlichem Nährboden so schwer fortzüchten, daß nur wenige Versuche bis zu seinem Absterben angestellt werden konnten.

Ein sehr starkes Wachstum wiesen alle hämolytischen Stämme im Kaninchenblut auf. Dem entspricht die leichte Erzielung von Streptokokken-Infektionen bei Kaninchen. Die grünen Streptokokken jedoch, die auch in den anderen Blutproben meist eine nur geringe Resistenz erkennen ließen, wurden auch hier abgetötet oder stark im Wachstum gehemmt; es dürfte daher die Avirulenz dieser Stämme für Kaninchen wohl angenommen werden.

Einige Bedeutung muß ferner dem Resultat der Proben mit Hundeblut beigemessen werden. Das alleinige Wachstum der Hundestreptokokken im Hundeblut und das sonst allgemeine Absterben aller anderen Streptokokken in demselben legt die Annahme nahe, daß die Ruge-Philippsche Methode auch bei dieser Tierart interessante Aufschlüsse über Infektionsmöglichkeiten und Virulenz des Erregers zu bieten imstande ist.

Endlich sei auf das unterschiedliche Verhalten der Menschenstreptokokken in den verschiedenen Tierblutarten hingewiesen. Auch in dieser Richtung sind weitere Untersuchungen erforderlich. Die obigen Versuche konnten nur den Zweck verfolgen, im Falle ihres Gelingens Anregung zu weiterer Bearbeitung der angeschnittenen Fragen

zu geben. Nur an einem großen klinischen Material kann entschieden werden, ob der Ruge-Philippschen Methode in der tierärztlichen Praxis etwa die gleiche Bedeutung zukommt wie in der menschlichen. Meine Untersuchungen haben jedenfalls eine Reihe von Beobachtungen ergeben, die sehr zugunsten einer solchen Annahme sprechen.

II.

Wie eingangs erwähnt, habe ich mich auch mit der von M. Küstner (10) angegebenen Virulenzsteigerung von Streptokokken durch ihre Züchtung in faulenden Geweben beschäftigt. Veranlaßten seine Ergebnisse schon an und für sich eine eingehende Nachprüfung, so bestand für mich im Falle der Bestätigung die Möglichkeit, für den Menschen ungefährliche Tierstreptokokken menschenvirulent zu machen und auch auf diesem Wege die Möglichkeit einer menschlichen Infektion mit Tierstreptokokken zu beweisen. Ich hielt mich bei meinen Untersuchungen genau an folgende Versuchsanordnung Küstners:

Frische Plazenta wurde 1 bis 2 Tage lang an der Luft der Fäulnis ausgesetzt. Es wurden, wenn anzunehmen war, daß genügend Fäulniskeime sich auf diesen Stücken angesiedelt hatten, haselnußgroße Stücke in gewöhnliche Fleischwasserbouillon gebracht und diese darauf 24 Std. lang in den Brutschrank bei 37° C gestellt. Die Bouillon roch dann intensiv faulig, die Organstücke schwammen infolge der Gasbildung an der Oberfläche. Diese Bouillon wurde nun mit Bouillonkultur frischer avirulenter Streptokokken beimpft. Die Stämme stammten von Portiokarzinomfällen aus der Universitätsfrauenklinik Berlin. Das Gemisch blieb 24 Std. im Brutschrank bei 37° C. Davon wurden am folgenden Tage 1—2 Oesen in 5—6 ccm frischer Bouillon verdünnt und hiervon 1—2 Ösen frischem defibrinierten Blut zugesetzt. Von dem Blut wurde eine Platte sofort, die zweite nach 4 Std. gegossen. Derselbe Streptokokkenstamm, der am Tage vorher in frische, gewöhnliche Bouillon geimpft worden war, wurde in derselben Weise auf seine Virulenz geprüft, um eine Kontrolle dafür zu haben, daß es sich wirklich um einen avirulenten Stamm handelte. Ferner wurde eine Blutplatte mit der unbeimpften Fäulnisbouillon angelegt, um sicher zu gehen, stets streptokokkenfreie Fäulnisbouillon benutzt zu haben.

Auf diese letzte Kontrollplatte verzichtete H. Küstner und überzeugte sich in mikroskopischen Abstrichen von der faulenden Plazenta, daß keine Streptokokken in ihr enthalten waren. Meine Methode erschien mir jedoch als wesentlich sicherer, nachdem ich mich von der großen Schwierigkeit, die Streptokokken aus der Flora der Fäulnisbouillon auszuschließen, überzeugt hatte.

In 18 Versuchen gelang es mir nun in keinem Falle, eine Virulenzerhöhung zu erzielen. Die Keime erschienen von der faulenden Plazenta gar nicht beeinflußt worden zu sein, da die Kontrollplatten ohne Plazentabeigabe, abgesehen von den gewachsenen Fäulniskeimen, genau dasselbe Bild boten. Auch dauernder Wechsel der Fäulnisbouillon, Differenzierung durch Altersunterschiede der faulenden Plazenta, Aufstellen der frischen Plazenta an verschiedenen Orten zum Faulen in der Erwartung, vielleicht eine andere Bakterienflora dadurch zu erzielen, führten nicht zum Ziele. Für das grelle Mißverhältnis zwischen Küstners fast restlosen Erfolgen und meinen absolut negativen Ergebnissen vermag ich eine befriedigende Erklärung nicht zu geben. Wahrscheinlich spielen Unterschiede in der Zusammensetzung der Fäulnis-

bouillon eine Rolle bei unseren abweichenden Ergebnissen. Eine Aufklärung hierfür könnten vielleicht auch die Ergebnisse von Philipp (12) über dieselbe Frage geben, der mit verschiedenen Aminosäuren eine Virulenzsteigerung zu erzielen vermochte. Es ist denkbar, daß in der Küstnerschen Fäulnisbouillon gerade einige dieser Eiweißabbauprodukte enthalten gewesen sind, während ich dieselben auf dem Wege der Mazeration mit der Küstnerschen Versuchsanordnung nicht zu erzeugen vermochte und demzufolge auch keine Virulenzerhöhung beobachten konnte.

Literaturangaben.

1) C. Ruge II, Med. Klin. 1923. Nr. 7. — 2) C. Ruge II, Arch. f. Gyn. Bd. 70. 1923. — 3) Philipp, Münch. med. Woch. 1923. Nr. 16. — 4) Philipp, Klin. Woch. 1923. Nr. 42. — 5) Radice, Dtsch. med. Woch. 1923. Nr. 41. — 6) Gambetti, Ibid. 1924. Nr. 18. — 7) Dreyer, Centralbl. f. Gyn. 1924. Nr. 31. — 8) E. Bumm, Centralbl. f. Gyn. 1924. Nr. 37. — 9) Lehmann, Klin. Woch. 1924. Nr. 40. — 10) H. Küstner, Centralbl. f. Gyn. 1924. Nr. 5. — 11) G. Seiffert, Dtsch. med. Woch. 1912. Nr. 7. — 12) Philipp, Centralbl. f. Gyn. 1924. Nr. 37.

Involutionsformen des Bacillus erysipelatos suis.

[Aus dem Alpenländischen Impfstoffwerk in Graz, Triesterhof (Wissenschaftl. Konsulent: Prof. Dr. Josef Schnürer).]

Von Dr. med. vet. **Adolf Sabella,** techn. Leiter.

Mit 3 Abbildungen im Text.

I.

Daß Bakterien unter der Einwirkung von chemischen Substanzen ihre Form ändern können, ist allgemein bekannt. Ich habe mir die Aufgabe gestellt, die Beeinflussung des Schweinerotlaufbazillus durch Saponin zu versuchen, wie dies bereits Dr. Dostal[1]) beim Tuberkelbazillus getan hat.

Für diese Versuche wurde dem einfachen, in seiner Zusammensetzung und Alkalität ziemlich konstanten Pferdefleischwasser-Pepton-Agar, der auch zu dem sonstigen Kultivieren des Schweinerotlaufbazillus Verwendung findet, 1 Proz. bzw. 2 Proz. Saponinum depurat. de Haen hinzugefügt. Die beimpften Schiefagarröhrchen wurden 24 bis 48 Std. in der Brutkammer belassen, innerhalb welcher Zeit ein Wachstum zu beobachten war, das sich von demjenigen auf gewöhnlichem Agar nicht wesentlich unterschied. Betrachtet man auf solchen Nährböden gezüchtete Bazillen in gramgefärbtem Präparat, so findet man ein ganz ungewohntes Bild. Die Bazillen sind, und zwar bei den einzelnen Stämmen ziemlich einheitlich, schätzungsweise um das 3—10-fache und auch darüber ihrer normalen Dimension vergrößert. Die Bilder der einzelnen Stämme sind sehr verschieden.

Während die Bazillen das eine Mal mäßig vergrößert, hierbei jedoch spindelförmig oder keulenförmig aufgetrieben sind, sind sie bei einem

1) Dostal, Die Glykosidform des Tuberkelbazillus. (Frankfurt. Zeitschr. f. Pathol. Bd. 19. H. 1/2.)

2. Stamme bei vielfacher Vergrößerung zu kürzeren oder längeren Fäden verbunden, ohne daß Teilungsstellen sichtbar wären. Solche Bilder haben Aehnlichkeit mit einem von der Leberoberfläche eines Meerschweinchens angefertigtem Präparate des Bacillus oedematis maligni. Bei einem 3. Stamme sind die Bazillen bei mehrfacher Vergrößerung plumpere Stäbchen, die bei einem 4. Stamme noch größere Dimensionen besitzen können. Besonders interessant sind Bilder, bei denen man drei Stäbchen ohne eine sichtbare Trennungslinie zu einem Stern verwachsen findet, oder wo ein Stäbchen das Aussehen der Epiphyse eines Röhrenknochens oder ähnlicher Figuren besitzt. Mitunter erhält man Präparate, in denen die Bazillenfäden an einem Ende eine kleine Kugel tragen, ähnlich einer in Entwicklung begriffenen Spore. Ein andermal findet man wiederum Fäden, deren Protoplasma in einzelne der Wand anliegende Teilstücke zerrissen erscheint. Man gewinnt den Eindruck, als ob das Protoplasma geschrumpft wäre, wobei die einzelnen, gut gefärbten Teilstücke, zwischen denen sich schlecht oder ungefärbte Lücken befinden, durch schmale, ebenfalls gut gefärbte Brücken verbunden sind.



Fig. 1. Saponinagarkultur eines 4×24 Std. bei ca. 12° C gehaltenen Schweinerotlaufstammes, nach 2 gewöhnlichen Agar- und 2 Saponinagarpassagen.



Fig. 2. Saponinagarkultur eines 6×24 Std. bei ca. 12° C gehaltenen Schweinerotlaufstammes, nach 2 gewöhnlichen- und 1 Saponinagarpassage.

Diese morphologischen Veränderungen des Rotlaufbazillus sind jedoch nicht allein bei den verschiedenen Stämmen verschieden, sondern es treten je nach Art und Dauer der Einwirkung beträchtliche Unterschiede auch bei ein und demselben Stamme auf. Während die Verschiedenheit der einzelnen Stämme auf einer individuellen Eignung der verschiedenen Stämme zu beruhen scheint, dürfte das variable Verhalten bei ein und demselben Stamme von der jeweilig für die einzelnen Individuen bestehenden Möglichkeit abhängen, sich den für die Entstehung dieser Formen notwendigen Lebensbedingungen anzupassen.

Werden die so veränderten Bazillen auf gewöhnlichen Agar überimpft, so erhält man innerhalb 24stünd. Wachstums wiederum Stäbchen von vollkommen normalem Aussehen.

Ich habe in der gleichen Zeit mit diesen Versuchen auch Kulturen eines Rotlaufstammes in gewöhnlicher Pferdefleischbouillon angelegt, die ich durch mehrere Wochen in der Brutkammer hielt, um hierbei

die eventuelle Entstehung von Variationsformen zu beobachten. Wurden aus dieser Bouillon gewöhnliche Schiefagarröhrchen beimpft, so gingen erst nach 2—3×24 Std. spärliche Kolonien auf, die jedoch beträchtlichen Umfang annahmen. Die Bazillen hatten normales Aussehen. Bei der Ueberimpfung auf 2proz. Saponinagar aus derselben Bouillonkultur war nach der gleichen Zeitdauer die Entstehung makroskopisch gleicher Kolonien zu beobachten. Die mikroskopische Untersuchung nach Gram gefärbter Ausstriche zeigte jedoch Bakterien, die in ihren Dimensionen und ihrem Formenreichtum die bisherigen Bilder saponinbeeinflußter Rotlaufstäbchen bei weitem übertrafen. Es waren darin langgezogene, schlauchartige Gebilde wahrzunehmen, die ungefähr das 20—30fache der Länge eines gewöhnlichen Rotlaufstäbchens besaßen. Die Enden waren in der Regel kolbig verdickt. Diese selbst waren grampositiv, während das Mittelstück blaßlila oder rötlich gefärbt war. Die Farben gingen allmählich ineinander über.

Neben solchen Formen gab es noch folgende andere: Bakterien von bedeutendem Umfange in Form einer Feige von 2 μ Durchmesser, ferner kleinere und größere Kugeln, 2—3 μ im Durchmesser, gestielt und ungestielt. Die meisten dieser Formen waren grampositiv, einzelne gramnegativ.



Fig. 3. Saponinagarkultur (3×24 Std. in der Brutkammer gehalten), eines leicht Involutionsformen bildenden Schweinerotlaufstammes, angelegt aus einer alternden Bouillonhultur.

Alle 3 Bilder wurden bei Betrachtung mit einem Reichert-Mikroskop, Homog. Oelimmersion $^1/_{12}$, num. Apert. 1,30 Okular IV gezeichnet und besitzen annähernd die doppelte Vergrößerung.

Als ich diese Kulturen nach einwöchentlicher Aufbewahrung bei Zimmertemperatur neuerlich untersuchte, fand ich ausschließlich gramnegative, mehr oder weniger gleichmäßig breite Fäden verschiedener Länge (8—10 μ) mit einer endständigen Kugel, daneben auch freiliegende Kugeln. Das Bild hatte, wenn man von der abnormen Länge einzelner Fäden absieht, viel Aehnlichkeit mit einem Präparat versporter Tetanusbakterien. Auch diese in ihrem Aussehen so weitgehend veränderten Bakterien gingen, auf gewöhnlichen Agar überimpft, innerhalb 24 Std. als normale Rotlaufstäbchen auf. Unter der Lupe sehen die Kolonien grob granuliert aus.

Auf Grund der Erscheinung, daß die schlauchartig und in Form von Kugeln ausgebildeten Involutionsformen bei denjenigen Saponinagarkulturen zur Entwicklung kamen, die aus der lang bebrüteten Bouillonkultur angelegt worden waren, vermutete ich zunächst, daß dies eine Folge der physikalischen und chemischen Einwirkungen sei, unter denen dieser Bakterienstamm während der langen Bebrütung in der eintrocknenden Bouillon gestanden hatte. Ich fand jedoch bei späteren Versuchen, daß in diesem Sinne ein Zusammenhang zwischen den beiden Tatsachen nicht bestehen dürfte. Es traten nämlich bei dem Rotlaufstamme Formen in Kugelform, allerdings in geringerer Zahl, auch dann auf, wenn er auf einem Agar mit einem höheren (1—1,5 Proz.)

Prozentgehalt an Kochsalz bei Zimmertemperatur gezüchtet wurde. Das Wachstum war auf diesem Nährboden bei Zimmertemperatur ein sehr langsames und spärliches. Auf der Platte konnte man die grobe Granulierung der Kolonien bei Besichtigung mit der Lupe sehr schön wahrnehmen.

Die verschiedenen morphologischen Veränderungen des Rotlaufbazillus sind nun nichts anderes als die sog. Involutionsformen oder nach der Bezeichnung Maaßens „teratologische Wuchsformen". Die Tatsache, daß Bakterien unter dem Einfluß giftig wirkender chemischer Substanzen, die in einer das Wachstum nicht mehr hemmenden Menge dem Nährboden zugesetzt werden, sonderbare Gestaltsveränderungen erleiden, war als erstem v. Gamaleia bekannt[1]). Eine besondere Bedeutung, weil spezifisch, besitzt die Erscheinung nach den Untersuchungen zahlreicher Forscher für die Diagnose des Pestbazillus, der auf 2,5—3,5proz. NaCl-Agar rundliche, blasige Involutionsformen bildet.

Nach den Untersuchungen Eisenbergs verhalten sich unter der Einwirkung von Farbstoffen die gramnegativen Bakterien hinsichtlich ihrer Neigung zur „Chemomorphosenbildung" proportional ihrer Empfindlichkeit für die hemmende Wirkung der Farbstoffe; von den grampositiven Bakterien zeigen nur die Diphtheriebazillen teratologische Wuchsformen auf farbstoffhaltigen Nährböden.

Wenn wir nun die Frage aufwerfen, warum gerade unter dem Einflusse des Saponins der grampositive Schweinerotlaufbazillus so leicht zur Bildung teratologischer Wuchsformen veranlaßt werden kann, so müssen wir zunächst die Frage berühren, was Involutionsformen sind, bzw. welchen chemisch-physikalischen Einflüssen sie ihre Entstehung verdanken.

Hammerl führt auf Grund seiner Untersuchungen bei Choleravibrionen die Formveränderungen der Bakterien bei Einwirkung von Neutralsalzen auf osmotische Vorgänge zurück, wobei das höher konzentrierte Salz des Nährbodens durch die semipermeable Zellmembran in den Bakterienleib eindringen soll. Nach den Anschauungen von H. Bechhold und H. Schloßberger hingegen sind die Formveränderungen nichts anderes, als das Produkt von Quellung oder Entquellung der kolloiden Substanzen des Bakteriums. Diese Anschauung findet insbesondere an der Tatsache eine Stütze, daß nicht nur osmotisch wirksame, sondern auch gut permeable Substanzen, wie die schnell diffundierenden Anilinfarbstoffe, ebenfalls zur Bildung von Involutionsformen führen können.

Nach v. Eisler scheinen die merkwürdigen Wuchsformen überall dort aufzutreten, wo es zu Aenderungen und nicht bloß zu Störungen in der Ernährung der Bakterienzelle kommt, und die Oberflächenvergrößerung der Zelle habe einzig und allein den Zweck, die Störung bzw. die Behinderung im Oxydationsprozeß zu paralysieren (Versuche von Bezssonoff bei Schimmelpilzen).

Involutionsformen unter dem Einfluß höherer oder niederer Konzentrationen von Kochsalz kamen bei meinen Versuchen nur bei einem Rotlaufstamm zur Ausbildung. Das Saponin erzeugt hingegen bei jedem Rotlaufstamm teratologische Wuchsformen. Wie wirkt nun das Saponin? Die Beantwortung dieser Frage geben uns die Forschungsresultate, die beim Studium der Saponinhämolyse erhalten wurden. Ich halte mich in den folgenden Erklärungen an die hierüber in Abderhaldens „Lehrbuch der physiologischen Chemie" 5. Aufl. enthaltenen Ausführungen.

Die Saponine sind pflanzliche Glukoside und bewirken ähnlich wie das Kobragift oder das Kreuzspinnengift schon in geringen Mengen Hämolyse. Die hämolysierende Wirkung des Kobragiftes besteht darin, daß die an der Bildung

---

1) Die folgenden Ausführungen halten sich zum Teil an die im Handbuch der mikrobiologischen Technik von Rudolf Kraus und Paul Uhlenhuth 1923 Abhandlung: Die physikalisch-chemischen Grundlagen der mikrobiologischen Methoden von H. Bechhold u. H. Schloßberger, enthaltenen Angaben, woselbst sich auch die entsprechenden Schriftquellen vorfinden.

der Hülle der roten Blutkörperchen teilnehmenden Phosphatide (Lecithin) fermentativ gespalten werden, und zwar wird von den Phosphatiden Oelsäure abgespalten. Durch die fermentative Aufspaltung des Lecithins bzw. durch die „Alteration des Systems Protein, Lecithin, Cholesterin“, welches nach den Untersuchungen Bechholds die Hülle der Erythrozyten bildet, werden die roten Blutkörperchen zur Abgabe des roten Farbstoffes veranlaßt, ohne daß hierbei ihr Stroma selbst sichtbar verändert wird.

Nach den Forschungen von Windaus liegen die Verhältnisse bei der Saponinhämolyse gan zähnlich wie bei der Hämolyse durch das Kobragift. Auch dieses spaltet von den Phosphatiden Oelsäure ab, und die hämolysierende Wirkung des Saponins geht bei den roten Blutkörperchen der verschiedenen Tierarten sogar parallel deren Gehalt an freier Phosphorsäure. Es ist die Frage allerdings noch nicht geklärt, ob diese Parallelität nicht eine Zufälligkeit ist.

Bechhold ist der Ansicht, daß die Grenzschicht der Bakterienzelle ebenfalls aus einer kolloiden Lösung von Cholesterin in Lecithin besteht, die ein Proteinnetzwerk erfüllt. Der Gehalt an Lipoiden („Lipoid“ ist nach Abderhalden ein Sammelname für die verschiedenen Phosphatide) ist nun nach der Ansicht Eisenbergs bei den grampositiven Bakterien gegenüber den gramnegativen ein relativ großer. Auf diesem Unterschied beruht unter anderem die von Eisenberg beobachtete Tatsache, daß die grampositiven Bakterien im Durchschnitt 600mal adsorbabler sind als die gramnegativen.

Ich nehme nun an, daß bei der Verwendung von saponinhaltigen Nährböden die Hülle der Rotlaufbazillen in dem gleichen Sinne beeinflußt wird wie die der Erythrozyten, daß also auch hier eine fermentative Spaltung des Lecithins durch das Saponin und damit eine Alteration des Systems: Protein, Lecithin, Cholesterin eintritt. Als Folgeerscheinung dieser Alteration kommt es nun zur Quellung der Zellkolloide und damit zur Formveränderung der Bakterienzelle. Nachdem die Nährböden die normale Konzentration an Salzen besaßen, so kann der quellende Faktor nicht in diesen gelegen sein. Ich bin vielmehr der Anschauung, daß als Ursache der Quellung die vom Lecithin abgespaltene Oelsäure anzusehen sein dürfte, die ja unmittelbare Wirkung entfalten kann. Ich stütze hierbei meine Ansicht auf die Forschungsergebnisse der physiologischen Chemie, so auf die Feststellung von Martin H. Fischer, daß Zellen und Gewebe sich gegenüber gelösten Stoffen und insbesondere auch gegenüber Säuren und Basen genau so verhalten, wie es bei den Versuchen mit einzelnen Gelen beobachtet worden ist. (Quellung von Gelatine durch Säuren, Quellung des lebenden Muskelplasmas durch Milchsäure.)

Ergebnisse und Schlüsse: 1) Der Bazillus des Schweinerotlaufes bildet auf saponinhaltigen Nährböden teratologische Wuchsformen (Involutionsformen). — 2) Die Bedingungen für die Entstehung dieser teratologischen Wuchsformen sind ähnlich wie bei den anderen Bakterien, die teratologische Wuchsformen zu bilden vermögen, d. h. es müssen Verhältnisse geschaffen werden, die ein verlangsamtes Wachstum und damit eine Anpassung der Bakterienzelle an die geänderten Lebensbedingungen ermöglichen.

II.

Im Anschluß an die vorstehende Veröffentlichung sei noch vorläufig mitgeteilt, daß ich aus monatealten Kulturen in gewöhnlicher Bouillon Rotlaufbazillen herausgezüchtet habe, die sich morphologisch nach Aussehen und Farbe der Kolonien und schließlich serologisch von normalen Rotlaufstäbchen wesentlich unterscheiden.

Die Bazillen aus Agarkolonien, gezüchtet aus der alten Bouillonkultur, sind groß, plump und bei langsamem Wachstum sogar vom Aussehen großer Kokken. Die Kolonien erscheinen unter der Lupe entsprechend der plumpen Gestalt der Bazillen grob granuliert. Sie besitzen gleichmäßige Wölbung, bei jüngeren Kolonien ist der Rand unregelmäßig. Die Farbe ist bei auffallendem Lichte eine lichtbraune, bei längerer Aufbewahrung dunkelt die Farbe des Zentrums nach. Die Kolonien von flächenhaftem Wachstum besitzen bei durchfallendem Lichte Opaleszenz von leichtem, blaugrünem Schimmer.

Diese Stäbchen werden bei Wachstum in Bouillon, der einige Tropfen hochwertigen Rotlaufserums zugesetzt wurden, nicht agglutiniert.

Da diese Bazillen bei Ausschaltung des Variationsreizes die normale Gestalt und die sonstigen Eigenschaften des Rotlaufbazillus wiederum annehmen, so kommt dieser Variation gemäß der Definition Toennissens der Charakter einer Modifikation zu[1]. Es ist mir jedoch auch gelungen, die Variation so konstant zu gestalten, daß ihr der Charakter der Alternation zukommt.

Die Variation des in seinem ursprünglichen Typus pathogenen Rotlaufstammes ist sowohl im Stadium der Modifikation als auch dem der Alternation für Mäuse völlig apathogen und bildet bei diesen auch keine Antikörper. Die Eigenschaft der Apathogenität bleibt dem Stamm auch dann erhalten, wenn er in den Typus zurückgeführt wird. Hingegen nimmt er hierbei in hervorragendem Maße die Fähigkeit an, im Organismus der Maus spezifische Antikörperbildung auszulösen.

Es wurden bis jetzt 46 weiße Mäuse bzw. braune Bastarde in vier Versuchsreihen einer einmaligen subkutanen bzw. intraperitonealen Impfung mit 0,01 bzw. 0,02 ccm einer 48stünd. B.K. unterzogen. Bei 45 dieser Mäuse konnte nach 9—12 Tagen eine vollkommene Immunität gegen die vielfach tödliche Dosis von verschiedenen originären Schweinerotlaufstämmen festgestellt werden. Eine immunisierte Maus erkrankte 1 Tag nach den 2 Kontrollmäusen und lebte bei vorhandener Freßlust bis zum 7. Tag nach der Infektion. Eine Milzvergrößerung bzw. andere typische Veränderungen waren nicht vorhanden. Bakterien konnten weder mikroskopisch noch durch Kulturverfahren nachgewiesen werden. Die bei allen Infektionsversuchen verwendeten Kontrollmäuse gingen am 2.—4. Tage an Rotlauf zugrunde.

Es kann somit gesagt werden, daß mit dieser aus lebenden, apathogenen Erregern bestehenden Rotlaufvakzine bei Mäusen eine sichere Immunität erzielt werden kann.

Die Beeinflussung des Tetanustoxins durch einige oxydierend wirkende Körper.

[Aus dem Bakteriologischen Laboratorium (Dr. G. Wesenberg) der Farbenfabriken vorm. Friedr. Bayer & Co., Elberfeld.]

Von **G. Wesenberg** und **A. Hoffmann.**

Der Wundstarrkrampf war während des Weltkrieges und besonders im Anfang desselben eine sehr häufige und gefürchtete Krankheits-

1) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 86.

erscheinung. Zahlreiche ältere und neuere Mittel wurden zu seiner Behandlung und Abschwächung herangezogen. Abgesehen von der allgemeinen und örtlichen Serumanwendung wurden empfohlen: die Allgemeinbehandlung mit Injektionen von Karbolsäure (Baccelli) oder mit Magnesiumsulfat (Meltzer und Auer), kräftige Ernährung und heiße Bäder, ferner die Beruhigungstherapie mit Narkoticis, von denen nach Müller das „Luminal" als besonders wirksam allgemeine Anerkennung gefunden hat. Für die Wundbehandlung bei Tetanusverdacht wurden dann vor allem die Wasserstoffsuperoxydpräparate empfohlen, und da war es besonders das „Ortizon", das sich vorzüglich bewährt hat.

Das „Ortizon" ist eine feste Wasserstoffsuperoxydverbindung mit Carbamid, die etwa 30 Proz. locker gebundenes Wasserstoffsuperoxyd enthält. Vor den Wasserstoffsuperoxydlösungen hat es den Vorzug der bequemeren Transportierbarkeit; ferner läßt es sich in Stäbchenform bringen und so besonders leicht auch in tiefere Wundkanäle einführen.

Weintraud ist wohl der erste gewesen, der die festen Wasserstoffsuperoxydpräparate und hier besonders das „Ortizon" für die lokale Wundbehandlung Tetanuskranker empfohlen hat. Weintraud kam hierzu wohl durch die Ueberlegung, daß der Tetanusbazillus als strenger Anaërobier infolge der reichlichen Abspaltung von Sauerstoff aus dem Wasserstoffsuperoxyd durch das Wundsekret ungünstige Lebensverhältnisse finden würde. So sagt auch Krecke: „Es mag ein Zufall sein, aber es scheint erwähnenswert, daß, seitdem wir methodisch alle ausgedehnten Weichteilverletzungen sofort mit Ortizonpräparaten behandelt haben, wir einen Tetanusfall nicht mehr erlebt haben."

Es lag nun der Gedanke nahe, daß das Wasserstoffsuperoxyd, in diesem Falle „Ortizon", auch das bereits gebildete Tetanustoxin in der Wunde unschädlich machen könnte, wie dies ja von einer Anzahl chemischer Substanzen bekannt ist. So sagt von Lingelsheim in Kolle-v. Wassermann „Handbuch der pathogenen Mikroorganismen" Bd. 4: „Bezüglich der für die Giftzerstörung geeigneten chemischen Mittel verweise ich auf die Arbeiten von Kitasato und Fermi und Pernossi. Hier sei nur erwähnt, daß die anorganischen Säuren, namentlich die Salzsäure, stark schädigend wirken. Bei einer einstündigen Einwirkung vernichten das Gift: Salzsäure 0,55 Proz., Schwefelsäure 0,735 Proz., Phosphorsäure 1,63 Proz. Die organischen Säuren bedürfen stärkerer Konzentrationen: Essigsäure 10 Proz., Buttersäure 6 Proz., Milchsäure 4 Proz. Sehr energisch wirken die Alkalien. Bei einer Einwirkungsdauer von einer Stunde wirken: die Natronlauge bei 0,3 Proz., Kalilauge 0,42 Proz., Aetzkalk schon bei 0,1 Proz. zerstörend. Stark schädigend wirken weiter vor allem oxydierende Substanzen wie Kaliumsuperoxyd, Wasserstoffsuperoxyd, auch organische Oxydasen aus Leber, Milz und Nieren. Ehrlich fand im Schwefelkohlenstoff ein sehr energisches Abschwächungsmittel." Am bekanntesten ist die speziell von Behring für Immunisierungszwecke angewandte Giftabschwächung mit Jodtrichlorid. Statt Jodtrichlorid benutzten Roux und Martin Lugolsche Lösung, die aber nicht entfernt in dem Maße wirksam ist."

Da sich bis 1914 im Schrifttum nähere Angaben über die Wirkung des Wasserstoffsuperoxydes auf das Tetanustoxin nicht finden, stellte Herr Wesenberg bereits 1914 eine größere Anzahl von Versuchen über die Zerstörung des Tetanustoxins durch Ortizon an, die wir dann

später zusammen weiter ausbauten und auch auf die chlorabspaltenden Oxydationsmittel „Caporit“ und „Tolid“ ausdehnten.

Werfen wir zuerst einen Blick zurück auf das in Frage kommende besondere Schrifttum, so können wir uns kurz fassen, da nur wenige Arbeiten bisher vorliegen. N. Sieber (1901) ließ Kalziumsuperoxyd auf Tetanustoxin einwirken und spritzte dann die Mischung Meerschweinchen ein; ähnlich verfuhr er mit Wasserstoffsuperoxyd. Aus seinen Angaben geht nur hervor, daß Kalziumsuperoxyd mit der 10—1000fachen Menge Tetanustoxin in 2—5 ccm Flüssigkeit verrieben innerhalb 4 Std. (kürzeste Frist) das Toxin zerstört hatte, ebenso, daß 0,5 ccm 1proz. Wasserstoffsuperoxydlösung die 10- und 20fache letale Dosis innerhalb 15 Min., die 400fache letale Dosis innerhalb 24 Std. entgiftete, während die 600fache letale Dosis innerhalb derselben Zeit nicht mehr vollständig zerstört wurde, so daß der Tod des Meerschweinchens erfolgte. E. Löwenstein wies dann 1903 durch einen Versuch nach, daß in einer Mischung von Tetanustoxin mit Tetanusantitoxin durch Wasserstoffsuperoxyd das Toxin zerstört wird, das Antitoxin aber erhalten bleibt. J. Schumacher untersuchte 1915 die Wirkung des ebenfalls Oxydationswirkung äußernden Ammoniumpersulfat auf Diphtherietoxin; die 8fach tödliche Dosis wurde durch 2 ccm einer 5proz. Lösung von dieser Substanz nach 10 Min. entgiftet; die analogen Befunde waren bei dem Tetanustoxin zu erheben. Schließlich ist noch eine Arbeit von Th. Moll (1920) zu erwähnen, die sich mit der Abtötung der Tetanussporen u. a. auch durch Perhydrol und Chlorkalk befaßt, auf die wir noch später zurückkommen werden.

Zur Gewinnung des für die nachstehend berichteten Versuche benutzten Tetanustoxins wurde eine 4 Tage alte Bouillonkultur eines virulenten gut toxinbildenden Tetanusstammes verwendet, die durch Züchtung unter anaëroben Bedingungen in bekannter Weise gewonnen war. Die Kultur wurde erst durch ein Papierfilter und dann hintereinander durch 2 Berkefeld-Filter filtriert und so ein völlig keimfreies Filtrat erzielt. Von diesem tötete 0,1 ccm eine Maus innerhalb 24 Std.; bei 0,01 ccm traten nach 24 Std. die ersten tetanischen Krämpfe auf, die nach 48 Std. äußerst heftig waren und in der folgenden Nacht zum Tode führten. Bei Injektion von 0,001 ccm stellte sich nach 48 Std. Krümmung des Rückens und eine beginnende Steifheit des rechten Hinterbeines (Injektionsstelle) ein, das nach 4 Tagen völlig steif war. Unter typischen tetanischen Krämpfen ging das Tier am 9. Tage ein. 2 Mäuse mit 0,0001 ccm des Kulturfiltrats geimpft, blieben völlig gesund. Hier möchten wir gleich einschalten, daß die Injektion stets subkutan am rechten Oberschenkel erfolgte, so daß sich dort auch die tetanischen Erscheinungen zuerst einstellten: wie Steifheit, Strecken der Gliedmaße.

Zur Herstellung eines Trockenpräparates nach Brieger und Fränkel wurden 1050 ccm des Filtrates mit Ammoniumsulfat (etwa 800 g) gesättigt, der oben schwimmende Schaum und der Bodensatz gesammelt und auf einem Tonteller ausgestrichen im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure getrocknet. Es hinterblieben 11,0 g Trockenrückstand, welche Menge einer Ausbeute von 1,05 Proz. entspricht. Von einer weiteren Reinigung dieses „Rohtoxins“, das noch größere Mengen von Ammoniumsulfat enthält, wurde Abstand genommen. Zur bequemeren Handhabung wurden von dem „Rohtoxin“ 0,25 g mit 24,5 g

Kochsalz verrieben, so daß also 1 g dieser Toxin-Kochsalzmischung genau 1 ccm des ursprünglichen Bouillonkulturfiltrates entsprachen.

Daß die Fällung des Toxins eine fast vollkommene gewesen ist, ergaben die nachstehenden Giftigkeitsbestimmungen an 6 Mäusen mit dieser Toxin-Kochsalzmischung. Als Grenzdosis wird danach die Menge von 1 mg NaCl-Toxin = rund 0,01 mg Rohtoxin entsprechend 0,001 ccm des Bouillonfiltrats ermittelt, welche etwa dieselbe Krankheitsdauer verursacht, wie die entsprechende Menge des Kulturfiltrats selbst; allerdings gehen die Krankheitserscheinungen bei der Maus, welche die höhere Dosis von 0,025 mg Rohtoxin erhalten hatte, nach längerer Dauer wieder völlig zurück. Die in dieser Arbeit benutzten Zahlenangaben beziehen sich immer auf das Original-Rohtoxin, von dem also 0,05 mg erforderlich sind, um den Tod der Mäuse sicher zu verursachen. Hier sei gleich bemerkt, daß die Nachprüfung der Giftigkeit der im Herbst 1914 hergestellten, inzwischen meist bei einer Temperatur von + 1 bis + 5° im Kühlschrank aufbewahrten Toxins, nur eine geringe Abnahme ergab, da die sichere tödliche Dosis Ende 1922 zu 0,075 mg für die Maus ermittelt wurde; das Toxin befand sich in einem mit gutem Korkstopfen verschlossenen Präparatenzylinderchen, das in eine Glasstopfenflasche eingestellt wurde.

Maus (20 g) erhält 0,1 mg: Steifheit des Beines nach 40 Std., Tod nach 4 Tagen (Tetanus).

Maus (19 g) erhält 0,075 mg: Steifheit des Beines nach 48 Std., Tod nach 4 Tagen.

Maus (21,5 g) erhält 0,05 mg: Steifheit des Beines nach 40 Std., Tod unter Krämpfen nach 9 Tagen.

Maus (19,5 g) erhält 0,025 mg: Steifheit des Beines nach 8 Tagen, das Bein bleibt 10 Tage lang steif, dann geht diese Erscheinung langsam zurück.

Maus (16 g) erhält 0,01 mg: Steifheit des Beines nach 9 Tagen, Rücken krumm, die tetanischen Erscheinungen nehmen langsam zu. Tod nach 12 Tagen.

Maus (16 g) erhält 0,005 mg: Keine Erscheiuungen, bleibt gesund.

Der Versuch, das Bouillonfiltrat (50 ccm) durch Vermischen mit wasserfreiem Natriumsulfat in Vakuumexisikkator über Schwefelsäure bei gewöhnlicher Temperatur in trockene Form überzuführen, ergab ein weißes Pulver. Versuche an Mäusen mit Mengen, die 5 mg des ursprünglichen Bouillonfiltrates entsprachen, bewiesen seine völlige Ungiftigkeit. Die bei der Wasserentziehung durch das Natriumsulfat vorübergehend entstehende konzentrierte Lösung dieses Salzes, das aus dem wasserfreien Zustand in die wasserhaltige Krystallform ($Na_2SO_4 + 10\ H_2O$) übergeht, hatte also genügt, das Tetanustoxin völlig zu zerstören.

I.

Zu den nachfolgenden Versuchen mit Ortizon wurden stets frisch hergestellte Lösungen des Rohtoxins bzw. der Toxin-Kochsalzmischung (letztere der leichteren Dosierung wegen) genommen. Die krankmachende Dosis des Toxins liegt also nach obiger Tabelle bei 0,01 mg, die sicher tödliche Dosis bei 0,05 mg Rohtoxin.

I. Versuchsreihe.

a) Maus (20,5 g) erhält 0,10 mg Toxin in 0,5 ccm Wasser gelöst, zu dem 0,3 ccm einer 10proz. Ortizonlösung 5 Min. vor der Injektion zugesetzt war, injiziert. Die Maus bleibt dauernd gesund. (Es hatte 0,03 g Ortizon in 0,8 ccm Gesamtflüssigkeit — also eine Lösung 1 : 27 auf das Tetanustoxin eingewirkt.)

b) Maus (22 g) erhält 0,10 mg Toxin in 0,5 ccm Wasser gelöst, auf das 5 Min. lang 0,1 ccm der 10proz. Ortizonlösung (Ortizonlösung also 1 : 60) eingewirkt hat. Auch diese Maus bleibt dauernd gesund, während

c) die Kontrollmaus mit derselben Toxinmenge ohne Ortizon nach 40 Std. krank wird und nach 5 Tagen tot ist.

II. Versuchsreihe.

Je 1,20 ccm Toxinlösung (= 0,1 mg Toxin in 0,5 ccm Wasser) werden mit 0,6 ccm, 0,3 ccm beziehungsweise 0,1 ccm 1proz. Ortizonlösung gemischt und davon Mäusen sofort (also nach höchstens 1 Min.) und nach 5 Min. langer Einwirkung 0,75, 0,65, 0,55 ccm eingespritzt; es bekommt also jede Maus 0,1 mg Tetanustoxin (siehe Tabelle I).

Tabelle I.

Maus. Gewicht	Tetanus-toxin	Ortizon		injiziert	Befund
		mg	Konzen-tration		
18 g Kontrolle	0,1 mg	.	.	sofort	nach 3 Tagen tot
12,5 g Kontrolle	0,1 „	.	.	„	nach $3^1/_2$ Tagen tot
15 g	0,1 „	2,5	1:300	„	nach 6 Tagen steifes Bein, etwa 10 Tage anhaltend, dann erholt
16 „	0,1 „	2,5	1:300	nach 5 Min.	dauernd normal
21 „	0,1 „	1,25	1:500	sofort	nach 48 Std. steifes Bein, nach 7 Tagen tot
21 „	0,1 „	1,25	1:500	nach 5 Min.	nach 6 Tagen ohne jede tetanische Erscheinung tot
12,5 „	0,1 „	0,4	1:1300	sofort	nach 48 Std. steifes Bein, nach 6 Tagen tot
13,5 „	0,1 „	0,4	1:1300	nach 5 Min.	nach 3 Tagen steifes Bein, nach 14 Tagen tot

Die Versuchsreihen I und II zeigen, daß bei einer Konzentration des Ortizons von 1:300 in der Lösung die mehrfach tödliche Dosis des Tetanustoxins fast augenblicklich derart entgiftet wird, daß nur eine vorübergehende Erkrankung eintrat. Auch durch eine Konzentration von 1:500 und sogar 1:1300 wird noch eine deutliche Schwächung des Toxins bei ganz kurzer Einwirkungszeit vor der Injektion verursacht. Kann das Ortizon aber 5 Min. lang auf das Toxin einwirken, so zerstört es bei 1:300 und 1:500 das Toxin völlig und bei 1:1300 noch zum größten Teil, da in diesem Falle der Tod sehr verspätet eintrat.

III. Versuchsreihe.

Die Mäuse erhalten je 0,15 mg Toxin auf das 1 bzw. $2^1/_2$, bzw. 5 Min. lang Ortizonlösungen der Konzentration von 1:33, 1:50, 1:100, 1:250, 1:500 eingewirkt hatten. Jedes Tier bekam 0,75 ccm der Flüssigkeit eingespritzt, so daß also jeweils 23 mg, 15 mg, 7,5 mg, 3 mg, bzw. 1,5 mg Ortizon auf die Toxinmenge einwirkten (siehe Tabelle II S. 421).

Auch diese erhöhte Tetanustoxingiftdosis wird durch 1:50 sofort völlig zerstört; durch 1:100 selbst bei nur 1 Min. währender Einwirkungszeit noch bedeutend geschwächt, bei $2^1/_2$ Min. aber völlig unwirksam gemacht. 1:250 und 1:500 Ortizon schädigen das Toxin bereits innerhalb 1 Min.; zur völligen Vernichtung muß die Einwirkungszeit aber $2^1/_2$ bis 5 Min. betragen.

Die folgenden Versuchsreihen IV und V sollten feststellen, welche Mengen von Tetanustoxin durch 1proz., 2proz., 5proz. und 10proz. Ortizonlösung innerhalb 1, $2^1/_2$ und 5 Min. unschädlich gemacht werden. Verwendet werden 0,5 ccm der doppelt konzentrierten Ortizonlösung mit 0,5 ccm der entsprechend doppelt konzentrierten Toxinlösung. Es kamen also jeweils 2 mg, 4 mg, 10 mg bzw. 20 mg Ortizon auf die betreffende Toxinmenge zur Einwirkung; die Toxinmengen waren also 0,25, 0,5, 1,0, 2,5 und 5 mg, entsprechend der mindestens 5-, 10-, 20-, 50- und 100fachen letalen Dosis. Eingespritzt wurden je 0,2 ccm der Mischungen. (Siehe Tabelle III S. 422 u. 423.)

Wenn wir das Ergebnis der beiden letzten Versuchsreihen aus der Tabelle III überblicken, so zeigt sich folgendes Resultat:

1) Die 1proz. Ortizonlösung, gleich 2 mg Ortizon, verändert die 5- und 10fache letale Dosis für Mäuse derart, daß Erkrankungen und Tod mit wesentlicher Verzögerung eintreten. Auch bei der 20fachen letalen Dosis macht sich noch eine, wenn auch nur geringe Abschwächung des Giftes bemerkbar. — 2) Die 2proz. Ortizonlösung, gleich 4 mg Ortizon, zeigt im allgemeinen dieselbe Wirkung wie die 1proz. Lösung. Kleine Unregelmäßigkeiten, wie sie die Tabelle aufweist, lassen sich bei solchen Tierversuchen nicht ganz vermeiden, zumal ein Teil der Versuchstiere innerhalb kurzer Zeit ohne jegliche Anzeichen von Tetanus aus anderen Ursachen eingingen. — 3) Die 5proz. Ortizonlösung = 10 mg Ortizon, zerstört die 5fache letale Dosis bei $2^1/_2$ Min. langer Einwirkung vollständig; die 10fache letale Dosis wird durch 1 und $2^1/_2$ Min. lange Einwirkung stark geschwächt, durch 5 Min. lange

Tabelle II.

Maus. Gewicht	Tetanus-toxin	Ortizon		injiziert	Befund
		mg	Konzen-tration		
12,5 g Kontrolle	0,15 mg	.	.	sofort	nach 3 Tagen tot
15,5 g Kontrolle	0,15 „	.	.	„	„ 4 „ „
19,5 g	0,15 „	23	1:33	nach 1 Min.	dauernd normal
20 „	0,15 „	23	1:33	nach $2^1/_2$ Min.	„ „
21 „	0,15 „	23	1:33	nach 5 Min.	„ „
23 „	0,15 „	15	1:50	nach 1 Min.	„ „
17 „	0.15 „	15	1:50	nach $2^1/_2$ Min.	„ „
16,5 „	0,15 „	15	1:50	nach 5 Min.	„ „
21 „	0,15 „	7,5	1:100	nach 1 Min.	nach 9 Tagen beginnende Steifheit. nach 17 Tagen tot
19 „	0,15 „	7,5	1:100	nach $2^1/_2$ Min.	dauernd normal
21 „	0,15 „	7,5	1:100	nach 5 Min.	„ „
17,5 „	0,15 „	3	1:250	nach 1 Min.	nach 4 Tagen beginnende Steifheit, 15 Tage anhaltend, dann Erholung
15 „	0,15 „	3	1:250	nach $2^1/_2$ Min.	nach 4 Tagen beginnende Steifheit, 12 Tage anhaltend, dann erholt
21 „	0,15 „	3	1:250	nach 5 Min.	dauernd normal
17,5 „	0,15 „	1,5	1:500	nach 1 Min.	nach 3 Tag. steif, nach 8 Tag. tot
17,5 „	0,15 „	1,5	1:500	nach $2^1/_2$ Min.	nach 3 Tag. steif, nach 11 Tag. tot
19 „	0,15 „	1,5	1:500	nach 5 Min.	dauernd normal

Einwirkung aber völlig zerstört. Bei der 20- und 50fachen letalen Dosis macht sich eine mit der Einwirkungszeit steigernde Verzögerung des Eintritts des Todes bemerkbar. Die 100fache letale Dosis wird nicht mehr erkennbar beeinflußt. — 4) Die 10proz. Ortizonlösung, gleich 20 mg Ortizon, zeigt im großen und ganzen die gleiche Wirkung wie die 5proz. Ortizonlösung.

Es muß noch erwähnt werden, daß die subkutane Einspritzung der 10proz. Ortizonlösung bei einigen Tieren schwere, fast sofort auftretende Schädigungen verursachte, die meist rasch vorübergingen, in einigen Fällen aber den Tod innerhalb weniger Minuten herbeiführten, so daß die Versuche wiederholt werden mußten. Offenbar handelt es sich um Tod durch Gasembolie, der bedingt ist durch die lebhafte Sauerstoffentwickelung, die bei der Berührung des Ortizons mit dem Unterhautbindegewebe eintritt. Auch der wiederholt in den Tabellen

Tabelle

Maus. Gewicht	injiziert nach	steif nach	tot nach	Bemerkung	Maus. Gewicht	injiziert nach	steif nach	tot nach	Bemerkung
1proz. Ortizon (2 mg)					2proz. Ortizon (4 mg)				
					100fache letale Dosis				
16 g	1 Min.	.	24 Std.	.	20 g	1 Min.	20 Std.	40 Std.	.
17,5 „	$2^1/_2$ „	24 Std.	40 „	.	14,5 „	$2^1/_2$ „	20 „	40 „	.
19 „	5 „	24 „	40 „	.	17 „	5 „	20 „	40 „	.
					50fache letale Dosis				
17 g	1 Min.	24 Std.	48 Std.	.	15 g	1 Min.	24 Std.	48 Std.	.
18 „	$2^1/_2$ „	24 „	40 „	.	16 „	$2^1/_2$ „	24 „	40 „	.
18 „	5 „	40 „	64 „	.	16,5 „	5 „	24 „	40 „	.
17,5 „ Kontrolle	.	24 „	40 „	.	.	.	.	.	.
					20fache letale Dosis				
18 g	1 Min.	40 Std	64 Std.	.	12 g	1 Min.	.	18 Std.	.
17 „	$2^1/_2$ „	40 „	90 „	.	16,5 „	$2^1/_2$ „	40 Std.	48 „	.
17 „	5 „	40 „	64 „	.	16,5 „	5 „	48 „	64 „	.
18 „ Kontrolle	.	24 „	40 „	.	.	.	.	.	.
					10fache letale Dosis				
18 g	1 Min.	40 Std.	90 Std.	.	17,5 g	1 Min.	.	18 Std.	.
20,5 „	$2^1/_2$ „	40 „	90 „	.	17 „	$2^1/_2$ „	.	18 „	.
15,5 „	5 „	40 „	8 Tg.	.	20 „	5 „	48 Std.	90 „	.
					5fache letale Dosis				
19 g	1 Min.	40 Std.	7 Tg.	.	18 g	1 Min.	3 Tg.	8 Tg.	.
17,5 „	$2^1/_2$ „	40 „	7 „	.	19 „	$2^1/_2$ „	3 „	8 „	.
16 „	5 „	40 „	9 „	.	16,5 „	5 „	10 „	.	langsam erholt
18 „ Kontrolle	.	24 „	48 Std.	.	.	.	.	.	.

vermerkte Tod ohne tetanische Erscheinungen nach 18 Std. (über Nacht) ist wohl vielfach auf Gasembolie zurückzuführen.

Die Ergebnisse der bisher berichteten Versuche legen die Vermutung nahe, daß neben der Zeit und der Stärke der Ortizonlösungen, die auf die jeweils gegebene Menge von Tetanustoxin eingewirkt hatten, auch die absolute Menge des Ortizons einen Einfluß ausgeübt hätte. Um nun für diese Annahme den Beweis zu erbringen, wurde eine neue Reihe von Versuchen angestellt, in der jeweils die 10fache letale Dosis (= 0,5 mg Rohtoxin) zur Anwendung kam, auf die 6 bzw. 4, bzw 2 mg Ortizon eingewirkt hatten und zwar sowohl als 2proz. als auch 1proz. und $^1/_2$proz. Lösungen. Die Einwirkungsdauer war stets genau $2^1/_2$ Min. (s. Tabelle IV S. 423).

Diese Tabelle IV sei der Uebersichtlichkeit halber in einer Form zusammengestellt, in der nur die Todeszeiten eingetragen sind. Auf 0,5 mg Tetanustoxin wirkt Ortizon ein (s. S. 424 oben):

III.

Maus. Gewicht	injiziert nach	steif nach	tot nach	Bemerkung	Maus. Gewicht	injiziert nach	steif nach	tot nach	Bemerkung
5proz. Ortizon (10 mg)					10proz. Ortizon (20 mg)				
(5 mg Rohtoxin).									
19 g	1 Min.	.	24 Std.	.	16 g	1 Min.	24 Std.	48 Std.	.
18,5 „	$2^1/_2$ „	24 Std.	48 „	.	19 „	$2^1/_2$ „	24 „	48 „	.
15 „	5 „	24 „	48 „	.	20,5 „	5 „	.	24 „	.
(2,5 mg Rohtoxin).									
23,5 g	1 Min.	24 Std.	48 Std.	.	21 g	1 Min.	48 Std.	5 Tg.	.
22 „	$2^1/_2$ „	40 „	3 Tg.	.	20,5 „	$2^1/_2$ „	48 „	5 „	.
19 „	5 „	48 „	5 „	.	18 „	5 „	.	20 Std.	.
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
(1,0 mg Rohtoxin).									
26 g	1 Min.	48 Std.	6 Tg.	.	20 g	1 Min	48 Std.	7 Tg.	.
19 „	$2^1/_2$ „	48 „	7 „	.	16 „	$2^1/_2$ „	.	48 Std.	kein Tetanus
20 „	5 „	48 „	11 „	.	19 „	5 „	5 Tg.	12 Tg.	.
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
(0,5 mg Rohtoxin).									
20 g	1 Min.	5 Tg.	6 Tg.	.	18,5 g	1 Min.	.	.	dauernd normal
19 „	$2^1/_2$ „	5 „	.	16 Tg. anhalt. erholt	17 „	$2^1/_2$ „	48 Std.	7 Tg.	.
21 „	5 „	.	.	dauernd normal	22,5 „	5 „	.	.	dauernd normal
(0,25 mg Rohtoxin).									
21,5 g	1 Min.	5 Tg.	8 Tg.	.	18,5 g	1 Min.	5 Tg.	7 Tg	.
23 „	$2^1/_2$ „	.	.	dauernd normal	18 „	$2^1/_2$ „	.	.	dauernd normal
22,5 „	5 „	.	.	dauernd normal	20,5 „	5 „	.	.	dauernd normal
20 „ Kontrolle	.	24 Std.	50 Std-	.	.	.	.	.	.

Tabelle IV.

Maus. Gewicht	Tetanus-toxin	Ortizon		injiziert	Befund
		mg	Konzentration		
21,5 g Kontrolle	0,5 mg	.	.	sofort	nach 48 Std. tot
20,5 g Kontrolle	0,5 „	.	.	„	nach 40 Std. Tetanus, nach 4 Tg. tot
19 g	0,5 „	6	2 - proz.	nach $2^1/_2$ Min.	nach 3 Tagen etwas steif, 8 Tage anhaltend, dann erholt
17,5 „	0,5 „	6	1 „	dgl.	nach 3 Tagen Tetanus, 6 Tagen tot
16 „	0,5 „	6	0,5 „	„	„ 3 „ „ 4 „ „
17,5 „	0,5 „	4	2 „	„	„ 3 „ „ 4 „ „
20 „	0,5 „	4	1 „	„	„ 3 „ „ 5 „ „
15,5 „	0,5 „	4	0,5 „	„	„ 3 „ tot (Tetanus)
16 „	0,5 „	2	2 „	„	„ 3 „ „ „
17,5 „	0,5 „	2	1 „	„	„ 3 „ Tetanus, 5 Tagen tot
23 „	0,5 „	2	0,5 „	„	„ 3 „ „ 4 „ „

Konzentration	6 mg	4 mg	2 mg
2 - proz.	lebt	4 Tage	3 Tage
1 „	6 Tage	5 „	5 „
0,5 „	4 „	3 „	4 „

Trotz einiger Unregelmäßigkeiten läßt sich tatsächlich erkennen, daß neben der Konzentration auch die absolute Menge der angewandten Ortizonlösung eine gewisse Rolle spielt, indem offenbar mit steigender Ortizonmenge die Zerstörung des Tetanustoxins zunimmt und entsprechend der Tod verzögert wird.

In den vorstehend berichteten Versuchen ist einwandfrei der Nachweis geführt worden, daß das Ortizon imstande ist, nicht unbeträchtliche Mengen an Tetanustoxin zu zerstören. Es ist natürlich noch wichtiger, die Entwickelung der Tetanusbakterien in der Wunde zu verhindern, indem sie durch geeignete Mittel entfernt bzw. abgetötet werden. Für die Wundreinigung werden die Wasserstoffsuperoxydpräparate besonders gern genommen, da sie in die Wunde gelangte Bakterien infolge der Sauerstoffentwicklung mechanisch mit dem entstehenden Schaum entfernen. Die Desinfektionswirkung des Wasserstoffsuperoxyds ist dabei natürlich ein weiterer erwünschter Faktor.

Nachdem bereits früher festgestellt war, daß durch Ortizon in 3proz., 5proz. und 10proz. Lösung die verschiedenen Bakterien (Staphylococcus, Streptococcus, Bacillus pyocyaneus, Bacterium coli und typhi) in ganz kurzer Zeit abgetötet werden, wurde der Versuch gemacht, die abtötende Wirkung gegenüber Tetanussporen festzustellen.

Es wurde daher 1 ccm einer stark tetanussporenhaltigen Bouillonkultur mit 9 ccm Wasser verdünnt und 0,3 g bzw. 1 g Ortizon sowie eine Messerspitze sterilen Bimssteinpulvers zugegeben. Mäuse erhalten von der Mischung je 0,1 ccm nach verschiedenen Zeiten eingespritzt. Der Bimssteinzusatz erfolgte, um in der Wunde gleichzeitig mit den Tetanussporen einen reizenden Fremdkörper zu haben und auf diese Weise den Tetanussporen für die Auskeimung und Toxinbildung günstige Bedingungen zu geben.

Zur Kontrolle erhielten 2 Mäuse je 0,1 ccm der Mischung ohne Ortizon direkt, 1 Maus nach 15. Min. langem Erhitzen auf 80° eingespritzt. Durch das Erhitzen sollte das Tetanustoxin, das natürlich in der Bouillonkultur enthalten war, zerstört werden (s. Tabelle V S. 425).

Der Tod der beiden ersten Kontrollmäuse ist also zweifellos auf die Toxinwirkung zurückzuführen; derjenige aber von der Kontrollmaus, die das erhitzte Toxin bekommen hat, ist durch Bakterienvermehrung und erneute Toxinbildung zwanglos zu erklären. Daß in diesem Falle der Tod verspätet erfolgte, ist wohl bedingt durch die dabei gleichzeitig erfolgte Schädigung der Vermehrungsfähigkeiten der Sporen. Eine 20 Min. lange Einwirkung des Ortizons auf die vorliegende Mischung von lebenden Tetanussporen und Tetanustoxin hat nach der Tabelle noch nicht ganz genügt zur Unschädlichmachung. Bei 40 Min. langer Einwirkung trat nur noch eine vorübergehende Erkrankung ein, während nach einer Einwirkung von 60 Min. sich die Proben als für Mäuse völlig unschädlich erwiesen. Es war also nach dieser Zeit auch der Tod der Sporen erfolgt. Um nun die störende Wirkung des Toxins von vornherein auszuschalten, wurde der Versuch in der Abänderung

Tabelle V.

1 ccm sporenhalt. Bouillonkultur + 9 ccm einer Lösung von 1 g Ortizon + 9 ccm Wasser; 0,1 ccm der Mischung injiziert.

Maus. Gewicht	sporenhaltige Bouillonkultur	Ortizon	injiziert nach	Befund
20,5 g Kontrolle	0,1	.	sofort	nach 24 Std. tot (Tetanus)
19 g Kontrolle	0,1	.	"	" 30 " " "
19,5 g Kontrolle	0,1 15 Min. auf 80° erhitzt	.	"	nach 7 Tagen beginnende Steifheit, nach 11 Tagen tot
20,5 g	0,1	10proz.	nach 1 Min.	nach 3 Tagen tot
20 "	0,1	10 "	2½ Min.	" 3 " "
16,5 "	0,1	10 "	5 "	" 3½ " "
23 "	0,1	10 "	10 "	" 3 " steif, n. 4 Tagen tot
15 "	0,1	10 "	20 "	" 4 " " n. 12 " "
21 "	0,1	10 "	40 "	" 7 " " , dann erholt
17,5 "	0,1	10 "	1 Std.	dauernd normal
18,5 "	0,1	10 "	2 "	" "
21,5 "	0,1	10 "	3 "	" "
17,5 "	0,1	10 "	5 "	" "
22 "	0,1	10 "	24 "	" "

wiederholt, daß die Bouillonkultur auf der elektrischen Zentrifuge mit 9000 Umdrehungen in der Minute längere Zeit zentrifugiert und der Bodensatz dann noch durch zweimaliges Auswaschen mit Wasser in der Zentrifuge von dem Rest des anhaftenden Toxins befreit wurde. Die Kontrollmäuse zeigten dann nach 2—3 Tagen Steifheit des rechten Hinterbeines; der Tod erfolgte nach 3—4 Tagen.

Gingen wir nun mit der Ortizonmenge in einem Versuch (siehe Tabelle VI) soweit herunter, daß in der Mischung nur 3 Proz. Ortizon

Tabelle VI.

1 ccm sporenhalt. Bouillonkultur + 9 ccm einer Lösung von 0,3 g Ortizon + 9 ccm Wasser; 0,1 ccm der Mischung injiziert.

Maus. Gewicht	sporenhaltige Bouillonkultur	Ortizon	injiziert nach	Befund
20,5 g Kontrolle	0,1	.	sofort	nach 24 Std. tot
21 g Kontrolle	0,1	.	"	" 2 Tagen tot
20 g	0,1	3 Proz.	2½ Min.	" 1 Tage steif, n. 2 Tagen tot
22 "	0,1	3 "	5 "	" 2 Tagen tot
21 "	0,1	3 "	10 "	" 2 " "
20,5 "	0,1	3 "	20 "	" 2 " "
17,5 "	0,1	3 "	40 "	" 2 " "
18 "	0,1	3 "	1 Std.	" 3 " "
21 "	0.1	3 "	2½ "	" 3 " steif, n. 5 Tagen tot
20 "	0,1	3 "	5 "	dauernd normal
18,5 "	0,1	3 "	7½ "	" "
22 "	0.1	3 "	24 "	" "

(= 1 Proz. H_2O_2) enthalten war, so erfolgte, wie aus der Tabelle VI hervorgeht, der Tod noch nach 1stünd. Einwirkung in der normalen Zeit. Nach 2stundenlanger Einwirkung trat die Erkrankung und der Tod sehr verspätet ein, ein Zeichen, daß die Sporen durch diese lange Einwirkungszeit stark geschädigt waren. Nach 5 Std. waren aber auch die Sporen abgetötet.

Nach der oben erwähnten Arbeit von Th. Moll wurden bei seinen Versuchen die Tetanussporen durch eine 1- und 2proz. H_2O_2-Lösung in 24 Std., durch eine 3proz. H_2O_2-Lösung in 2 Std. unschädlich gemacht. Die Ergebnisse decken sich also praktisch mit den von uns erhaltenen.

II.

Anschließend an die Versuche mit „Ortizon" wurden solche mit „Caporit" angestellt. Richter bezeichnet die Anwendung des Caporits in der Wundbehandlung als die „glänzend vereinfachte und verbesserte Dakinsche Methode." Hierunter versteht man die Desinfektion mit einer durch Oxydation desinfizierend wirkenden hypochlorithaltigen Lösung. Sie ist erst im Verlaufe des Weltkrieges zur allgemeinen Verbreitung gekommen und hat in der Folge auch in der Veterinärmedizin Eingang gefunden. Sehr zeitraubend und unangenehm war aber die jedesmal frische Herstellung der Lösung; dazu kommt, daß die Chlorpräparate (Chlorkalk sowie Natriumhypochlorit) im allgemeinen eine sehr wechselnde Zusammensetzung haben und außerdem durch die Einwirkung von Licht und Luft rasch zersetzt werden; ihre Desinfektionskraft ist daher natürlich auch recht unsicher und schwankend. Die Uebelstände vermeidet das von den Farbenfabriken vorm. Friedr. Bayer & Co. in Leverkusen in den Handel gebrachte „Caporit", ein hochprozentiges Kalziumhypochlorit. Es ist dies ein weißes, in Wasser leicht lösliches, lange haltbares Pulver; die gering getrübte wäßrige Lösung zeigt eine schwache alkalische Reaktion und einen kräftigen Chlorgeruch.

Ueber die Desinfektionswirkung des Caporits liegt eine eingehende Arbeit von Weißenrieder-Bern (1922) vor. Außerdem hat Wesenberg (1915) diesen Chlorkalk zur Trinkwassersterilisation im Felde mittels des Desazonverfahrens eingeführt und darüber eingehend berichtet. Wir beschränken uns daher an dieser Stelle mit seiner Wirkung auf das Tetanustoxin. Zu unseren Versuchen wurde das Rohcaporit mit einem Gehalt von rund 59 Proz.[1]) wirksamen Chlor angewandt. Als Versuchstiere wurden infolge vorübergehenden Mangels an Mäusen weiße Ratten genommen. Das Tetanustoxin war dasselbe, das zu den Ortizonversuchen benutzt war.

Es mußte zunächst festgestellt werden, in welcher Dosis das Tetanustoxin an Ratten wirksam ist. Mit Rücksicht auf die großen Gewichtsunterschiede der vorhandenen Tiere wurden die Dosierungen auf 100 g Ratte bezogen.

I. Versuchsreihe:

Von einer Lösung von 0,05 Tetanustoxin : 50 ccm Kochsalzlösung erhält:

Ratte I 220 g = 0,85 ccm, d. h. 0,375 mg je 100 g Körpergewicht
Ratte II 217 „ = 1,1 „ „ 0,5 „ „ 100 „ „
Ratte III 165 „ = 1,25 „ „ 0,75 „ „ 100 „ „

1) Neuerdings wird auch das Rohcaporit mit einem Gehalt von etwa 70—75 Prom. Cl. in den Handel gebracht.

Nach einem Tage keine krankhaften Erscheinungen; nach 2 Tagen zeigen sich zuerst bei Ratte II und III, einige Stunden später auch bei Ratte I an dem rechten Hinterbein (Injektionsstelle) Lähmungserscheinungen, nach 3 Tagen bei allen drei Ratten völlige Versteifung der rechten Hintergliedmaßen, nach 5 Tagen ist die Versteifung noch intensiver; die Tiere sind ganz unbeholfen; beim Anstoßen an den Käfig heftiges Zusammenschrecken. Nach 8 Tagen Ratte III, nach 10 Tagen Ratte I und nach 13 Tagen Ratte II tot. Die unterste tödliche Dosis ist also noch nicht sicher bestimmt, da 0,375 mg je 100 g, die kleinste geprüfte Menge, noch ebenso wirkte, wie die nächst höhere Gabe von 0,5 mg. Auffallend ist der späte Eintritt der Wirkung bei diesen allerdings besonders kräftigen Ratten im Verhältnis zu den Mäusen, bei sonst etwa gleicher Empfindlichkeit, sofern man das Körpergewicht berücksichtigt.

In der folgenden II. Versuchsreihe sollte die Einwirkung des Caporits auf die etwa fünffache tödliche Tetanus-Toxinmenge (= 1,5 mg je 100 g Ratte) festgestellt werden. Da nun die Annahme nahe lag, daß das Caporit nach der Injektion noch auf das Tetanustoxin einwirken könnte, sollte es nach der von Wesenberg angegebenen Formel mit Ortizon zu dem indifferenten Chlorkalzium umgesetzt werden, ehe es zur Einspritzung kam:

$$Ca\begin{matrix} OCl \\ Cl \end{matrix} + H_2O_2 = CaCl_2 + H_2O + 2O$$

Es ist etwa die $1^1/_2$fache Menge von Ortizon zur Bindung des aus dem Caporit entwickelten Chlors erforderlich. Bei den im I. Teil berichteten Versuchen mit Ortizon war eine längere Nachwirkung des Ortizons nach der Injektion nicht anzunehmen, da es ja durch die Katalase des Blutes an der Injektionsstelle rasch zerstört wird. Allerdings wird auch das „Chlor" des Kalziumhypochlorits durch organische Stoffe (z. B. Eiweißkörper) ziemlich rasch gebunden, aber nicht so schnell, wie die Zersetzung des H_2O_2 durch die Katalase erfolgt.

Zum Versuch wurden also 6,5 ccm einer Tetanustoxinlösung (0,15 g zu 25 ccm Kochsalzlösung) mit 6,5 ccm Caporitlösung (0,5 g : 25 ccm NaCl) versetzt, wobei starkes Aufschäumen eintritt. Es wirken also in diesem Versuch auf 1 Teil Tetanustoxin 3,3 Teile Caporit in 1proz. Lösung ein. Nach 5, 15 und 30 Min. werden je 2 ccm der Mischung mit 1 ccm NaCl-Lösung und 1 ccm Ortizonlösung (0,9 : 25 NaCl) versetzt und von dieser Mischung sofort je 1 ccm (0,25 ccm der anfänglichen Tetanustoxinlösung = 1,5 mg Toxin) auf 100 g Ratte injiziert. Die Kontrollratte, die nach 24 Std. die ersten Krankheitserscheinungen zeigte, stirbt nach 5 Tagen am Tetanus, während die drei eigentlichen Versuchstiere dauernd gesund bleiben.

Das erwähnte Aufschäumen beim Zusatz des Caporits zur Tetanustoxinlösung ist ein Zeichen dafür, daß das benutzte Tetanustoxin zersetzend auf das Caporit einwirkt, dieses — d. h. das Caporit — also zersetzt wird; eine Unschädlichmachung des Caporits erübrigte sich also möglicherweise. Es war dies um so mehr zu berücksichtigen, als ja im 1. Teil der Arbeit gezeigt war, daß das Ortizon für sich schon auf das Tetanustoxin rasch zerstörend einwirkt. (Hier sei betont, daß der Tetanusbazillus die Fähigkeit, Katalase zu bilden, nicht besitzt, worauf z. B. Löwenstein [1903] hingewiesen hat.) Es wurden daher einige chemische Versuche über die Bindung des Chlors aus dem Caporit durch Tetanustoxin angestellt. Die Bestimmung des Chlorgehalts der Caporitlösungen erfolgte in der bekannten, vom Deutschen Arzneibuch vorgeschriebenen Weise durch Titration der mit Jodkalium versetzten und angesäuerten Chlorkalklösung mittels $^1/_{10}$-Normal-Natriumthiosulfatlösung unter Zusatz von Stärkelösung als Indikator. Werden 0,1 g Caporit in 10 ccm Wasser mit 0,03 g Tetanustoxin, in 5 ccm NaCl-Flüssigkeit gelöst, gemischt, so tritt — wie schon erwähnt — Aufschäumen ein; nach 5 Min. erfolgt Verdünnung mit Wasser, Zusatz von Jodkalium, Schwefelsäure und sofortige Titration. Es werden

so 5,9 ccm n/10 Thiosulfatlösung verbraucht, während dieselbe Menge (0,1 g) Caporit direkt titriert 16,5 ccm — entsprechend einem Gehalt von 58,6 Proz. aktiven Chlor — verbraucht hatte. Das Tetanustoxin hatte also unter diesen Verhältnissen rund $^2/_3$ des Chlors aus dem Caporit chemisch gebunden. Wirkt in ganz entsprechender Weise auf nur 0,05 g Caporit dieselbe Menge (0,03 g) Tetanustoxin ein, so verbleiben nach 5 Min. nur noch ganz geringe Mengen von freiem Chlor, die dann im Tierkörper noch rasch gebunden werden, also nicht mehr nachträglich zerstörend auf das eingespritzte Tetanustoxin wirken werden. Weitere Untersuchungen ergaben dann, daß das Aufschäumen der Mischung von Caporit mit Tetanustoxin vor allem bedingt ist durch die Einwirkung des Kalziumhypochlorits auf das im Rohtoxin noch enthaltene Ammoniumsulfat; beide Körper wirken aufeinander ein unter Stickstoffentwicklung.

Nach dem Ergebnis dieser chemischen Untersuchung war es daher nicht ausgeschlossen, daß in der bisherigen Versuchsreihe die Vernichtung des Tetanustoxins eine Folge der nachträglichen Einwirkung des H_2O_2 gewesen ist. Es wurden daher die später folgenden Versuchsreihen ohne nachträglichen Zusatz von Ortizon eingestellt. Wir beschränkten uns darauf, das Caporit 5 Min. lang auf die etwa 5fache letale Dosis des Tetanustoxins = 1,5 mg für 100 g Ratte einwirken zu lassen.

In der III. Versuchsreihe (Tabelle VII) kamen auf 1 Teil Tetanustoxin 2,1 bzw. 0,5 Teile Caporit, in der IV. Versuchsreihe 0,33, 0,16 bzw. 0,1 Teile Caporit

Tabelle VII.

Ratte. Gewicht	Tetanustoxin je 100 g	Caporit	NaCl	Konzentration der Cap.-Lösung	Cap.: Tetanustoxin	Befund
135 g Kontrolle	1,5 mg	.	.	.	.	nach 5 Tagen tot
100 g	1,5 „	3,0 mg	0,5	1:160	2:1	dauernd gesund
100 „	1,5 „	1,5 „	0,5	1:330	1:1	„ „
95 „	1,5 „	0,75 „	0,5	1:670	1:2	„ „
115 „ Kontrolle	1,5 „	.	.	.	.	nach 6 Tagen tot
100 g	1,5 „	0,5 „	0,5	1:1000	1:3	dauernd gesund
105 „	1,5 „	0,25 „	0,5	1:2000	1:6	„ „
100 „	1,5 „	0,15 „	0,5	1:3300	1:10	„ „
105 „ Kontrolle	1,5 „	.	.	.	.	nach 6 Tagen tot
102 g	1,5 „	0,05 „	0,5	1:10000	1:30	„ 9 „ „
110 „	1,5 „	0,015 „	0,5	1:33000	1:100	„ 8 „ „

5 Min. lang zur Einwirkung. Alle 6 Versuchstiere zeigten keinerlei Krankheitserscheinungen, während die Kontrollratten in der üblichen Weise erkrankten und starben. Erst in der V. Versuchsreihe, in der 1 Teil Tetanustoxin mit 0,033 bzw. 0,01 Teil Caporit, also dem 30. bzw. 100. Teil versetzt wurde, erkrankten diese beiden Tiere und starben gleichzeitig mit der Kontrollratte.

Aus diesen Versuchsreihen sehen wir, daß das Caporit in noch viel ausgesprochenerem Maße als das Ortizon die Fähigkeit besitzt, verhältnismäßig große Mengen Tetanustoxin in kürzester Zeit zu zerstören. Es genügt 1 Teil Caporit, um 10 Teile Tetanustoxin in 5 Min. zu

zerstören, entsprechend 1 Teil aktives Chlor auf etwa 16 Teile Toxin; hierbei ist aber zu berücksichtigen, daß zweifellos ein großer Teil des Caporits durch das im Tetanustoxin als Verunreinigung noch vorhandene Ammoniumsulfat zersetzt wird, ehe es auf das Toxin einwirken kann.

III.

Als 3. Präparat, welches durch seine oxydierende Wirkung das Tetanustoxin vernichten könnte, wurde das Tolid-Natrium der Farbenfabriken versucht. Es ist dies das Para-Toluolsulfonchloramid-Natrium, $CH_3\langle\ \ \rangle—SO_2—NClNa + 3H_2O$, das ebenfalls in der Veterinärmedizin in der Form des Streupulvers Anwendung findet. Das Tolidnatrium enthielt nach der Titration, die in ganz entsprechender Weise wie beim Caporit angegeben ausgeführt wurde, 25,9 Proz. aktives Chlor.

In diesem Präparat ist, im Gegensatz zum Ortizon und Caporit, die oxydierend wirkende Gruppe verhältnismäßig fest gebunden. Leitet man z. B. durch eine Tolid-Natriumlösung Kohlensäure, so bemerkt man nur einen schwachen „Chlor“-geruch, und nach $^1/_2$ Std. langem Durchleiten eines kräftigen Kohlensäurestromes ist eine Abnahme des Chlorgehaltes in der Lösung durch Titration kaum nachweisbar (z. B. 14,85 ccm n/10 Natrium Thiosulfatverbrauch nach CO_2, gegen 14,95 ccm vorher), unter der CO_2-Einwirkung ist ein kristallinischer Körper ausgefallen, der aus der unzersetzten freien Säure des Tolids besteht. Eine annähernd gleich starke Caporitlösung mit CO_2 behandelt, läßt einen starken „Chlorgeruch“ und bei der Titration eine deutliche Abnahme des Chlorgehaltes — z. B. von 18,0 ccm auf 17,5 ccm n/10 Natrium-Thiosulfat — erkennen. Die Lösung enthält dann den größten Teil des Hypochlorits als freie unterchlorige Säure, wie sich aus der direkten Titration nach Jodkaliumzusatz (aber ohne Schwefelsäurezusatz) mit Thiosulfat ergibt. Durch Ammoniumsalze wird das Tolid nicht zersetzt, so daß also beim Zusatz zum Tetanustoxin eine Gasentwicklung nicht stattfindet. Daß das Wasserstoffsuperoxyd äußerst leicht seinen aktiven Sauerstoff verliert, ist bekannt — erfordert doch die Aufbewahrung der Lösungen bereits besondere Vorsicht.

Als Versuchstiere wurden diesmal wieder Mäuse benutzt, die mit der 2—50fachen letalen Dosis des mit Tolid-Natrium vorbehandelten Tetanustoxins geimpft wurden.

In der ersten Versuchsreihe kamen auf 0,2 mg Tetanustoxin 0,2, 0,1, 0,05 und 0,02 mg Tolid-Natrium in 2 ccm Gesamtflüssigkeit 5 Min. lang zur Einwirkung; von der Mischung wurden je 1 ccm verimpft = 0,1 mg Tetanustoxin. Während das mit der größten Dosis Tolid-Natrium versetzte Tetanustoxin nach 5 Min. langer Einwirkung bei der Maus sich als ungiftig erwies, hatten die kleinen Mengen nicht genügt, das Tetanustoxin zu zerstören, so daß die Mäuse, wenn auch verspätet, nach 9 Tagen eingingen. (Tabelle VIII S. 430.)

In der nächsten Versuchsreihe wurden je 2 mg Tetanustoxin in 1 ccm NaCl gelöst mit 1,0, 0,5, 0,3 bzw. 0,1 ccm Tolidnatriumlösung (1:2500) versetzt und nach 5 Min. langer Einwirkung je 1 ccm Mischung Mäusen injiziert. Irrtümlicherweise war der Zusatz von Wasser unterblieben, so daß sich die in Tabelle IX

Tabelle VIII.

Maus. Gewicht	Tetanus-toxin	Tolid Na	NaCl	Konzentration der Tolidlösung	Tolid: Tetanustoxin	Befund
17 g	0,1 mg	0,1 mg	1 ccm	1:10000	1:1	dauernd gesund
19 „	0,1 „	0,05 „	1 „	1:20000	1:2	nach 9 Tagen tot
19 „	0,1 „	0,025 „	1 „	1:40000	1:4	„ 9 „ „
18 „	0,1 „	0,015 „	1 „	1:100000	1:10	„ 9 „ „
17 „ Kontrolle	0,1 „	.	1 „	.	.	„ 4 „ „

Tabelle IX.

Maus. Gewicht	Tetanus-toxin	Tol-Na-Lösung 1:2500	Gesamt-volumen	Konzen-tration der Tolidlösung	Tolid: Tetanus-toxin	je 1 ccm gespritzte Tetanus-toxin	Befund
16 g	1 ccm = 2 mg	1,0 ccm = 0,4 mg	2,0 ccm	1: 5000	1:5	1,0 mg	dauernd gesund
16 „	1 ccm = 2 mg	0,5 ccm = 0,2 mg	1,5 „	1: 7500	1:10	1,33 „	nach 4 Tagen tot
17 „	1 ccm = 2 mg	0,3 ccm = 0,13 mg	1,3 „	1:10000	1:15	1,53 „	„ 4 „ „
18 „	1 ccm = 2 mg	0,1 ccm = 0,04 mg	1,1 „	1:25000	1:20	1,80 „	nach 24 Std. tot
15 „ Kontr.	.	.	.	.	.	0,41 „	„ 50 „ „
17 g Kontr.	.	.	.	.	.	0,6 „	„ 48 „ „
17 g Kontr.	.	.		.	.	1,0 „	„ 48 „ „

niedergelegte Versuchsanordnung ergab. Wie aus dieser Tabelle hervorgeht, hatte die Dosis von 0,4 mg Tolid auf 1 mg Tetanustoxin das Toxin zerstört, während die nächste kleinere Menge von 0,2 mg Tolid auf 1,33 mg Tetanustoxin nicht zur Zerstörung genügte, und ebenso auch die weiteren kleineren Dosen versagt hatten.

Infolge dieses Versehens wurde der Versuch in der beabsichtigten Anordnung wiederholt. Es wurden je 2 mg Tetanustoxin in 1 ccm NaCl gelöst und mit 1,0 0,5, 0,33, 0,2 und 0,1 ccm Tolidnatriumlösung (1:2500) versetzt unter gleichzeitiger Auffüllung mit NaCl auf 2 ccm. Nach 5 Min. langer Einwirkung erhalten die Mäuse je 1 ccm der Mischung injiziert. Die Tabelle X zeigt, daß 0,2 mg und 0,1 mg

Tabelle X.

Maus. Gewicht	Tetanus-toxin	Tolid Na	NaCl	Konzentration der Tolidlösung	Tolid: Tetanustoxin	Befund
20 g	1 mg	0,2 mg	1 ccm	1: 5000	1: 5	dauernd gesund
17 „	1 „	0,1 „	1 „	1:10000	1:10	„ „
17 g	1 „	0,066 „	1 „	1:15000	1:15	nach 6 Tagen tot
21 „	1 „	0,04 „	1 „	1:25000	1:25	„ 3 „ „
18 „	1 „	0,02 „	1 „	1:50000	1:50	„ 3 „ „
19 „ Kontrolle	.	.	1 „	.	.	nach 60 Std. tot

Tolidnatrium entsprechend einer Konzentration 1:5000 bzw. 1:10000 bei 5 Min. langer Einwirkung genügt hatten, 1 mg Tetanustoxin zu zerstören; bei 0,066 mg Tolidnatrium (1:15000) trat deutliche Verzögerung des Todes ein, während die kleineren Tolidmengen versagten.

Auch beim Tolid ist die Zerstörung des Tetanustoxins nicht nur abhängig von dem gegenseitigen Verhältnis beider Bestandteile, sondern offenbar auch von der Zeit und der Konzentration der Tolidlösung, wie dies ja auch entsprechend für die Ortizon- und Caporitwirkung nachgewiesen wurde.

Im Durchschnitt zerstört ein Gewichtsteil Tolid-Natrium, ebenso wie ein Gewichtsteil Caporit, etwa 10 Gewichtsteile unseres Tetanustoxins innerhalb 5 Min., während zur gleichen Leistung umgekehrt 10 Teile Ortizon auf 1 Teil Toxin erforderlich sind; von Ortizon ist also die 100fache Menge notwendig als vom Tolid bzw. Caporit. Vom chemischen Standpunkt aus sind nun bezüglich ihrer Oxydationswirkung 16 g Sauerstoff gleichwertig mit 71 g (2×35,5 g) Chlor; diese Mengen sind enthalten in:

113 g Ortizon (mit 30 Proz. H_2O_2 bzw. 14,1 Proz. O) bzw. 121 g Caporit (mit 58,6 Proz. Cl) bzw. 274 g Tolid-Natrium (mit 25,9 Proz. Cl); es entspricht also

1 g Ortizon = 1,07 g Caporit = 2,42 g Tolid-Natrium. Hieraus ergibt sich, daß das verhältnismäßig festgebundene Chlor im Tolid-Natrium 2,42×100 = rund 240mal wirksamer ist als der Sauerstoff im Wasserstoffsuperoxyd (Ortizon). Für das als Hypochlorit vorliegende Chlor im Caporit ist die Wirksamkeit mindestens 100mal so hoch als für den Sauerstoff des Wasserstoffsuperoxyds. Durch die Anwesenheit des Ammoniumsulfats im Tetanustoxin wird ein Teil des Hypochlorits im Caporit zersetzt, geht also für die Einwirkung auf das Tetanustoxin verloren; die Wirksamkeit des Caporits liegt demnach noch bedeutend höher als die des Tolid-Natriums.

Zusammenfassung.

Wenn wir die vorstehenden Versuche überblicken, so können wir die Ergebnisse kurz, wie folgt, zusammenfassen:

1) Das Tetanustoxin wird aus dem keimfreien Bouillonkulturfiltrat durch Aussalzen mit Ammoniumsulfat nach Brieger und Fraenkel so gut wie völlig und ohne wesentliche Zerstörung gefällt. Dieses getrocknete Rohtoxin behält bei der Aufbewahrung in gut geschlossenem Gefäß bei einer Temperatur von $+1^0$ bis $+5^0$ seine Giftigkeit mindestens 9 Jahre lang fast unverändert. Es wurde versucht, das toxinhaltige Kulturfiltrat dadurch in die trockene Form überzuführen, daß demselben wasserfreies Natriumsulfat in solcher Menge zugesetzt wurde, daß die gesamte Flüssigkeit von dem Natriumsulfat als Kristallwasser aufgenommen wurde. Dieses so gewonnene Trockenpräparat erwies sich als fast völlig ungiftig. — 2) Das Tetanustoxin wird durch das ein festes Wasserstoffsuperoxyd darstellende Ortizon rasch zerstört, und zwar ist etwa die 10fache Menge von Ortizon(gleich der etwa 3fachen Menge von H_2O_2, bzw. der $1^1/_2$fachen Menge von aktivem Sauerstoff) erforderlich, um das benutzte Tetanustoxin in 5 Min. unwirksam zu machen. Bei kürzerer Einwirkungsdauer ist eine größere Menge Ortizon notwendig als bei längerer Dauer, wie dies ja auch von Desinfektionsversuchen her allgemein bekannt ist.

Aber nicht nur das gegenseitige Verhältnis zwischen Ortizon und Tetanustoxin ist von Bedeutung, sondern offenbar auch die Konzentration der Ortizonlösung.

Auch auf Tetanussporen wirkt das Ortizon bei längerer Einwirkung abtötend. — 3) Das Kalziumhypochlorit in Form des Caporits wirkt bedeutend energischer auf das Tetanustoxin ein, indem 1 Teil Caporit etwa 10 Teile Tetanustoxin in 5 Min. zu zerstören vermag, entsprechend 1 Teil aktives Chlor auf rund 16 Teile Tetanustoxin. — 4) Das Tolid, in dem das Chlor bedeutend fester gebunden ist als im Caporit, ist bezüglich seiner zerstörenden Wirkung auf das Tetanustoxin dem Caporit etwa gleichwertig. — 5) Zur Vernichtung der gleichen Menge Tetanustoxin ist vom Ortizon etwa die 100fache Gewichtsmenge erforderlich als vom Caporit, und die 240fache als vom Tolid-Natrium. Auf chemische Aequivalenz bezogen ist das locker gebundene Chlor im Caporit mindestens 100mal, das fester gebundene Chlor im Tolid-Natrium etwa 240mal so aktiv gegenüber dem Tetanustoxin, als der Sauerstoff im Wasserstoffsuperoxyd des Ortizons.

Schrifttum.

1) Baccelli, Berl. klin. Woch. 1911. Nr. 23. — 2) Meltzer u. Auer, ebenda, 1906. S. 73. — 3) Müller, Ed., Einige Ratschläge für die Behandlung des Wundstarrkrampfes. (Münch. med. Woch. 1914. S. 2257.) — 4) Weintraudt, Berliner klin. Woch. 1914. Nr. 42. — 5) Krecke, Münch. med. Woch 1915. S. 286. — 6) v. Lingelsheim, Kolle-Wassermann, Handbuch der pathogen. Mikroorganism. Bd. 4. S. 737. — 7) Sieber, N., Ueber die Entgiftung der Toxine durch die Superoxyde, sowie tierische und pflanzliche Oxydasen. (Ztschr. f. physiol. Chemie. Bd. 32. 1901. S. 573. — 8) Löwenstein, E., Ueber Katalase in Bakterienfiltraten. (Wiener klin. Woch. Bd. 50. 1903. S. 1393.) — 9) Schumacher, J., Ueber Entgiftung von Diphtherie- und Tetanustoxin. (Dtsch. med. Woch. Bd. 41. 1915. S. 310.) — 10) Moll, Th., Untersuchungen über die Wirksamkeit einiger chemischer Desinfektionsmittel auf Tetanussporen. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 84. 1920. S. 435) — 11) Brieger, L., und Fraenkel, Untersuchungen über Bakteriengifte. (Berl. klin. Woch. Bd. 11. 1890. und Bd. 12.) — 12) Richter, Caporit, die glänzend vereinfachte und verbesserte Dakinsche Methode. (Tierärztl. Rundsch. 1921. Nr. 20.) — 13) Weißenrieder, F. H., Ueber Caporit, ein neues Desinfektionsmittel. (Schweizer Arch. f. Tierheilk. 1922. Heft 6/7.) — 14) Wesenberg, G., Die Trinkwassersterilisation mit Chlorkalk im Felde. (Hyg. Rundsch. 1915. H. 8.) — Ders., Die Trinkwasserversorgung im Felde. (Dtsch. med. Woch. 1917. Nr. 19.)

Ein Fall von X 19-Infektion.

[Aus der II. Medizinischen Universitätsklinik (Vorstand: Prof. N. Ortner) und dem Pathologisch-Anatomischen Universitätsinstitut in Wien (Vorstand: Prof. R. Maresch).]

Von Privatdozent Dr. **V. Kollert**, und Dr. **K. Bauer**,
Assistent der Klinik Assistent des Institutes.

Das Problem des Verhaltens der verschiedenen Proteus-Stämme ihrer agglutinatorischen Beziehung zum Fleckfieber ist eines der bei dieser Krankheit am meisten diskutierten, trotzdem aber nicht in allen

seinen Punkten gelöst. Insbesondere war die Meinung von Weil und Felix, daß die sog. spezifischen X_{19}-Stämme nur aus dem Organismus eines Fleckfieberkranken zu züchten seien, viel umstritten. Die Ergebnisse einiger Untersucher, denen es gelungen war, auch aus anderem Material jene Stämme zu gewinnen, wurden von den genannten Autoren jedesmal bekämpft. Unter anderen traten auch A. Finger und V. Kollert der Frage näher und konnten 1918 aus 120 Blutproben, die von Nichtfleckfieberkranken (meist Dysenteriekranken) stammten, drei Proteus-Stämme isolieren, die mit Fleckfieberserum eine deutliche Reaktion zeigten.

Da nun der von uns beobachtete Fall wieder einen Beitrag zu dieser Frage darstellt, und da er uns auch andererseits Gelegenheit bietet, dem Agglutinationsproblem der X-Stämme näherzutreten, wollen wir über ihn vorerst berichten und dann auf die Einwände eingehen, die von Weil und Felix gegen die oben zitierten Untersuchungen erhoben worden waren.

Im Mai 1922 wurde auf die II. medizinische Klinik ein 55jähriger Brauergehilfe aufgenommen, der mit 20 Jahren eine gonorrhoische Infektion akquiriert hatte. Bis zum Januar 1912 war er gesund, damals traten heftige Schmerzen in der Harnröhre auf, weshalb er in einem Krankenhause Aufnahme fand. Dort wurde eine zystoskopische Untersuchung vorgenommen, die aber wegen vorhandener Strikturen zu keinem Ergebnis führte; darnach Fieber und kolikartige Schmerzen, die von der linken Nierengegend gegen die Blase zu ausstrahlten. Der Harn war trüb und zeigte positive Eiweißreaktion. Aehnliche kolikartige Anfälle wiederholten sich 1917, 1918 und 1922; wegen der letzten akuten Erkrankung und des andauernd trüben Harnes suchte Pat. die Klinik auf.

Die klinische Untersuchung ergab: Ein chronisches Nierenleiden mit 210 mm Hg Blutdruck, etwas verzögerter Wasserausscheidung und mangelhafter Konzentrationsfähigkeit. RN 102 mg, keine Retinitis nephritica; geringgradige Albuminurie; Prostatahypertrophie; chronische Cystitis mit Trabekelblase; linksseitige Pyelitis (?).

Die bakteriologische Untersuchung des Harnes, der reichlich polynukleäre Leukozyten im Sediment enthielt, ergab Bact. coli und einen Proteus-Stamm. Die nähere Analyse des letzteren wies folgende Ergebnisse auf:

Agarplatte: Sehr zarte, feine, unregelmäßig begrenzte Kolonien, von denen die älteren ein schwachgelbliches, äußerst feingekörntes Zentrum zeigten; hauchförmige Ausläufer, so daß bald die ganze Platte von einem Rasen überwuchert erscheint.

Agar schräg: Saftig glänzende Belege, etwas getrübtes Kondenswasser. — Bouillon: Stark getrübt, ziemlich reichlicher Bodensatz. Indol positiv. Lebhaft bewegliche, Gram-negative Stäbchen.

Da uns nun die Möglichkeit fehlte, das Verwandtschaftsverhältnis zu den spezifischen X_{19}-Stämmen festzustellen, sandten wir eine Reinkultur an Herrn Prof. Russ, der in dankenswerter Weise die Freundlichkeit hatte, Agglutinationsproben anzustellen. Wir lassen den wörtlichen Befund folgen:

„Nr. 5151.

Die Agglutination mit einem im obigen Laboratorium vorhandenen agglutinierenden Kaninchenserum — hergestellt mit einem Stamme X_{19} — ergab folgendes Resultat:

Serumverdünnung	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800
H X_{19} Prag	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	—
O X_{19} Prag	+++	+++	+	negativ				
Prot. vulg.	+++	Spur	negativ					
Stamm Kl. Ortner	+++	+++	+++	+++	+++	· ++	negativ	

Es dürfte sich um X_{19} H handeln.
Wien, am 4. Juli 1922. Prof. Russ.“

Die Agglutination mit dem Serum eines Fleckfieberkranken, dessen Ueberlassung wir dem serotherapeutischen Institute in Wien verdanken, zeigte folgendes Verhalten:

Serumverdünnung	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800
X_{19} Paltauf	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	±
Prot. vulg.	++	+			negativ			
Stamm Ortner	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+

Agglutinationsversuche mit dem Patientenserum (aktiv und inaktiv) zeigten folgende Ergebnisse:

Serumverdünnung	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1200	1/2400	1/4800
Stamm Ortner	+++ g	+++ g	+++ g	+++ g	+++ g	+++ gf	++ f	++ f	+ f	—
H X_{19} Paltauf	+++ g	+++ g	+++ g	++ gf	++ gf	± f	—	—	—	—
Proteus vulg.	+++ g	+++ g	+++ gf	++ f	—	.	.	.	.	.

g = grobflockig, f = feinflockig.

Weil und Felix fordern noch, daß bei der Fleckfieber-Diagnose das betreffende Serum sowohl mit H- als auch mit O-Stämmen agglutiniere. Wir erhielten von Dr. Gruschka aus Aussig a. E. einen O X_{19}-Stamm und nahmen hierauf die betreffende Untersuchung vor, die folgendes Ergebnis zeigte:

Agglutination des Krankenserums mit O X_{19} (Dr. Gruschka).

1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1250	1/4800
+++f	+++f	+++f	+++f	+++f	+++f	+++f	+f	—

Unter den aus der Literatur bekannten Fällen, in denen es gelang, aus Material, das von Nicht-Fleckfieberkranken stammte, spezifische X_{19}-Stämme zu züchten, wollen wir den Fall von Weltmann und Molitor hervorheben. Diese beiden Autoren erwähnen, daß es bei den von Weil und Felix gezüchteten Stämmen möglich sei, die H-Forrm auf 5proz. Traubenzuckeragar in die O-Form überzuführen. Auch diesen Versuch führten wir aus und konnten schon in der 1. Generation nichtschwärmende O-Formen auf dem oben erwähnten Nährboden erzielen. Auch auf Karbolagar (zu 100 Teilen 2proz. Agars 4 Volumsteile 5proz. Phenollösung) gelang uns die Umzüchtung prompt. Schließlich versuchten wir noch, nach den Angaben von Eisler und Silberstein auf ausgetrocknetem Agar die Umzüchtung, wobei wir ebenfalls schon bei der 1. Generation aus H-Formen O-Formen erhielten. Es bleibt noch, die Agglutination des derartig umgezüchteten O-Stammes mit dem Patientenserum zu untersuchen, wobei wir folgendes Ergebnis erhielten:

Agglutination des Patientenserums mit der O-Form des Stammes Ortner.

1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2400	1/4800	1/10000
+++f	+++f	+++f	+++f	+++f	+++f	++f	+f	∓f	—	—

Die Bedeutung unseres Falles können wir am besten ersehen, wenn wir die Forderungen, die von den verschiedenen Autoren auf Grund ihrer Erfahrungen mit der Weil-Felix-Reaktion an diese Probe gestellt werden, mit den Ergebnissen unserer Untersuchung vergleichen.

Munk folgert aus der Gesamtheit der Befunde über den diagnostischen Wert der Weil-Felixschen Reaktion, daß der positive Ausfall der Probe in der Verdünnung 1/100 Fleckfieber fast mit Sicherheit annehmen läßt. Wie unser Fall also zeigt, kann eine Proteus-Infektion gleichfalls eine positive Weil-Felix-Reaktion bedingen. Wenn Oettinger, abgesehen von einer Agglutination bis 1/200, für die Feststellung eines Typhus exanthematicus noch verlangt, daß die Agglutination bis 1/50 grobflockig sein muß, so beweist unser Fall, daß auch dieses Kriterium für die Fleckfieberdiagnose nicht genügt. In dem Serum unseres Kranken war ja die grobflockige Reaktion mit H X_{19} bis 1/160 deutlichst, mit O X_{19} sogar bis 1/600 noch nachweisbar. Dieser Befund erinnert an die Angaben Heims, wonach Fleckfiebersera mit O-Stämmen langsamer, aber bis zu einem höheren Titer agglutinieren als mit H-Stämmen. Sera von Kranken mit Proteus-Infektionen können sich demnach analog verhalten.

Wir prüften ferner die Angaben von C. Prausnitz. Nach diesem Autor sind die Agglutinine bei einer Proteus-Infektion thermostabil, während sie bei Fleckfieber thermolabil sind. Mit anderen Worten: Eine positive Weil-Felix-Reaktion mit aktivem und inaktivem Serum soll das Vorhandensein einer Proteus-Erkrankung anzeigen; der positive Ausfall mit aktivem und gleichzeitig negative mit inaktivem Serum soll auf Fleckfieber weisen. Wie unsere Untersuchung ergibt, verhält sich das Blut unseres Kranken wie das einer Proteus-Erkrankung.

Weil und Felix schreiben (1917): „Mit dem Fleckfieberserum geben die saprophytischen (Proteus-) Stämme ... keine spezifische Agglutination, nur das Serum von fleckfieberkranken Menschen ist zur Erkennung der spezifischen Proteus-Stämme geeignet.“ Auf Grund der hier mitgeteilten Befunde müssen wir dieser Angabe widersprechen; denn unser Proteus-Stamm wurde von einem Fleckfieberserum bis zur Titergrenze agglutiniert. Es könnte dabei noch der Einwand erhoben werden, daß es sich um einen Kranken handelt, der im Kriege Fleckfieber überstanden habe und derzeit nun X_{19}-Träger sei. Gegen diesen Einwurf spricht, daß der Kranke schon vor dem Kriege seine Cystitis hatte und daß man ihm bei der Untersuchung im Jahre 1912 sagte, seine Krankheit sei durch einen ungewöhnlichen Erreger bedingt. Ferner war er während des ganzen Krieges im Hinterland, und es kam seines Wissens kein Fleckfieberfall in seiner Umgebung vor.

Ein 2. Einwand wäre der, daß es sich bei unseren Befunden vielleicht um eine Verunreinigung unserer Kulturen mit X_{19} handeln könnte. Gegen diese Annahme spricht zunächst, daß in dem Laboratorium, in dem die obigen Untersuchungen ausgeführt wurden, vorher nicht mit X_{19} gearbeitet wurde. Weiter geht auch aus dem agglutinatorischen Verhalten des Krankenserums einwandfrei hervor, daß der Patient ein Träger der X_{19}-Infektion ist. Weil und Felix haben bezüglich der X_{19}-Stämme, die von Nichtfleckfieberkranken stammen, bereits 1918 den Einwand der Laboratoriumsverunreinigung erhoben. Weltmann und Molitor stellen in ihrer Publikation die Gründe zusammen, die gegen diesen Vorwurf sprechen. Auch ist erwähnenswert. daß die Kulturen von Finger und Kollert sich in mehrfacher Hinsicht von den damals verwendeten Proteus-Stämmen X_{19} unterschieden (Agglutinationstiter, Daueraufschwemmung). Leider sind am Ende des Krieges die damals benützten Stämme zugrunde gegangen, so daß uns eine nochmalige Untersuchung derselben unmöglich war. Wolff

hat die Angaben von Finger und Kollert nachgeprüft und fand unter 116 Proteus-Stämmen, die nicht von Fleckfieberkranken stammten, 3, die von hochwertigem Fleckfieberserum bis zur stärksten Verdünnung agglutiniert wurden. Einer dieser Stämme zeigte sogar höhere Agglutinationswerte als X_{19}.

Aoki und Kondo berichten über ähnliche Untersuchungen. Sie konnten unter 178 Proteus-Stämmen, die von Nichtfleckfieberkranken stammten, 11 züchten, die mit Fleckfieberserum stärker reagierten als mit Normalserum. Von diesen 11 gaben 4 mit Fleckfieberserum eine so starke Reaktion, daß mit ihnen eine positive Weil-Felix-Reaktion zu erhalten war.

Nach dem hier Mitgeteilten kommen wir zu dem Schluß, daß die Angabe von Weil und Felix, nur das Serum des an Fleckfieber erkrankten Menschen sei zur Erkenntnis der spezifischen Proteus-Stämme geeignet, in dieser Form den Tatsachen nicht entspricht. — Ueber das Verhalten primärer OX_{19}-Stämme zum Fleckfieber sagt unser Fall nichts aus. Es harrt noch der Beantwortung, ob die primär als OX_{19} auftretenden Stämme mit den sekundär aus H-Formen gezüchteten O-Typen biologisch identisch sind. Unseres Erachtens wäre weiteres Forschen nach dem Vorkommen von OX_{19}-Stämmen außerhalb des Körpers von Fleckfieberkranken für die Beantwortung der hier aufgeworfenen Fragestellung sehr wünschenswert, da nach der letzten Veröffentlichung von Weil und Felix gerade diesen Stämmen spezifische Eigenschaften zukommen. Es ist in dieser Hinsicht bemerkenswert, daß das Serum unseres Kranken OX_{19} bis 1/1280 agglutinierte.

Wir haben somit bei einem Kranken, der anscheinend weder an Fleckfieber gelitten hatte, noch mit Fleckfieberkranken in Berührung gekommen war, eine chronische Cystitis gefunden, als deren Erreger ein Bacterium coli und ein HX_{19} anzusprechen sind.

Die Untersuchung stellt einen weiteren Beitrag dazu dar, daß die sog. spezifischen Proteus-Stämme (X_{19}) auch außerhalb des Organismus von Fleckfieberkranken vorkommen können.

Literatur.

Aoki u. Kondo, The Tohoku Journ. Exp. Med. Vol. 3. 1922. — Eisler u Silberstein, Ztschr. f. Hyg. 1921. — Felix, Ztschr. f. Immunf. Bd. 35. 1922. — Finger u. Kollert, Wien. Klin. Woch. Bd. 10. 1918. — Heim, Lehrb. d. Bakt. 1922. — Munk, in Kraus-Brugsch. Bd. 2. Teil 3. S. 416. — Oettinger, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 80. — Prausnitz, Ibid. Bd. 84. — Weil u. Felix, Wien. Klin. Woch. 1917, 1918. — Weltmann u. Molitor Ibid. Bd. 25. 1919. — Wolff, Berl. Klin. Woch. 1919.

Nach Abschluß unserer Arbeit im Juli 1924 erschien in der Wien. klin. Wochenschr. Nr. 31 eine interessante Veröffentlichung von Curt Sonnenschein über „Pseudo-Weil-Felix-Reaktion bei Proteus-Infektion". Wenn nun Sonnenschein bei einem Kinde, das an keiner Fleckfiebererkrankung leidet oder gelitten hatte, eine positive Weil-Felix-Reaktion erhält, so ist dies ein analoger Befund, wie bei unserem Kranken. Sonnenschein bezeichnet sein Resultat als eine Pseudoreaktion, da sie thermostabil ist, d. h. sowohl mit dem aktiven wie inaktiven Serum ein positives Ergebnis zeigte — ein ebenfalls mit unserem Befund übereinstimmendes Resultat. Nur in einem Punkte gehen unsere Ergebnisse auseinander, indem nämlich der von uns gezüchtete Proteus-Stamm von Fleckfieberserum agglutiniert wird, somit in die Gruppe der X-Stämme gehört.

Beiträge zum Wesen der Wassermannschen Reaktion

2. Mitteilung: Zur Frage der Reversibilität der Wassermannschen Reaktion, zugleich eine Antwort auf den Aufsatz v. Wassermanns „Zur Frage der Spaltbarkeit des syphilitischen Antigenserumaggregates“ (9).

[Aus der Serodiagnostischen Abteilung der Dermatologischen Klinik der Universität Breslau (Direktor: Geh. Med.-Rat Prof. Dr. Jadassohn) und dem Hygiene-Institut der Universität Greifswald (Stellvertretender Direktor: Prof. Dr. Carl Prausnitz).]

Von **Margarete Stern** und **Carl Prausnitz.**

I.

Wir haben in unserer 1. Mitteilung (5, S. 257), in Anlehnung an die Befunde von Hecht (2), Berczeller (1), Neukirch (4) und Nathan (3), angenommen, daß sich das syphilitische Antigen (Extraktbestandteile) und Syphilisserum in der Abwesenheit von Komplement nur locker, reversibel, binden, daß aber die Bindung unter dem Einfluß des Komplements eine wesentliche Verfestigung erfährt. Es erschien aussichtsreich, unter Anwendung der von v. Wassermann und Citron (8) angegebenen Filtermethode durch ein mit Kieselgur imprägniertes Papierfilter die Richtigkeit dieser Annahme zu belegen. Zu diesem Zweck wurden 2 Parallelreihen mit verschiedenen Konzentrationen von Extrakt und Syphilisserum angesetzt: die eine Reihe erhielt einen Zusatz von Komplement, in der anderen Reihe fehlte dieser. Beide Reihen wurden nach der in unserer ersten Mitteilung ausführlich beschriebenen Methode filtriert. Dann wurden die beiden so gewonnenen Filtrate auf ihren Gehalt an wirksamen Substanzen geprüft: jedes Filtrat wurde in 3 Teile geteilt, ein Teil wurde mit Extrakt und Komplement, ein anderer mit Syphilisserum und Komplement, der dritte mit Komplement allein versetzt und in der üblichen Weise auf Komplementbindung untersucht. Das Ergebnis eines solchen Versuchs zeigt das nachstehende Protokoll Nr. 1.

Protokoll Nr. 1.

Gemische wechselnder Konzentrationen von Extrakt und Syphilisserum Gren., teils mit, teils ohne Komplement, 1 Std. bei 37° digeriert und durch Kieselgur filtriert. Prüfung des Filtrats auf Extraktüberschuß durch Zusatz von Syphilisserum und Komplement, (b) auf Syphilisserumüberschuß durch Zusatz von Extrakt und Komplement; (c) ferner Zusatz von Komplement allein in fallenden Mengen zum Nachweis von gleichzeitiger Anwesenheit von Extrakt und Syphilisserum im Filtrat.

Gemische von			Zusatz von				Ergebnisse im Filtrat
Extr.	Syphser.	Kompl.	(a) Syphser	(b) Extr.	(c) Komplement 1:10	(c) Komplement 1:20	
1:45	1:4	1:10	c	+	c	c	Syphser.-Ueberschuß
1:5	1:8	1:10	+	c	c	c	Extraktüberschuß
1:45	1:4	—	c	+	c	fc	Syphser.-Ueberschuß
1:5	1:8	—	**+**	**+**	c	f**+**	Syphser.- u. Extraktüberschuß

Wie man sieht, tritt die störende gleichzeitige Anwesenheit von Syphilisserum und Extrakt im Filtrat in der Serie ein, die ohne Komplementzusatz angesetzt war, nicht aber in den mit Komplement versetzten Gemischen, eine Beobachtung, die wir in zahlreichen, ähnlichen Versuchen regelmäßig bestätigt fanden. Beweisend für diese Deutung unseres Versuches ist die Kolumne (c); denn hier binden die Filtrate der komplementfrei angesetzten Gemische nach der Filtration Komplement, sie müssen also sowohl freies Syphilisserum wie Extrakt enthalten; dagegen binden die Filtrate der mit Komplement angesetzten Gemische kein Komplement. In den letzteren Gemischen sind daher Extrakt und Syphilisserum so fest wie möglich miteinander verankert, und deshalb findet man im Filtrat nur etwaige Ueberschüsse von Extrakt oder Syphilisserum vor. Dieser Versuch ist daher eine Bestätigung dafür, daß die Verbindung von Extrakt und Syphilisserum durch die gleichzeitige Gegenwart von Komplement eine weitgehende Verfestigung erfährt. Das Komplement bewirkt also hier, wie es die Nathanschen Untersuchungen wahrscheinlich gemacht hatten, eine Aufhebung der Reversibilität der Bindung von Extrakt und Syphilisserum. Der Versuch ist eine weitere Stütze unserer Auffassung, daß eine Spaltung des „Wassermann-Aggregates“ (Extrakt + Syphilisserum + Komplement) im Kieselgurfilter nicht stattfindet.

Wir haben alsdann unsere Ergebnisse mit der Sachs-Georgischen Flockungsmethode kontrolliert. Hierbei sind bekanntlich die für die Wassermann-Reaktion in der Regel verwendeten alkoholischen Menschenherzextrakte, die wir für unsere bisher beschriebenen Untersuchungen benutzt hatten, ungeeignet. Wollten wir bei dem Filtrationsverfahren deutliche Ausschläge mit der Flockungsreaktion erhalten, so war es demnach nötig, das Filtrat

1) zum Nachweis eines Syphilisserumüberschusses im Filtrat mit einem Sachs-Georgi-Extrakt (cholesterinhaltig) zu versetzen;
2) ein Nachweis von Extraktüberschuß im Filtrat war nach dieser Methode nur denkbar, wenn von vornherein Gemische aus Sachs-Georgi-Extrakt, Syphilisserum und Komplement der Filtration unterworfen wurden; andere alkoholische Extrakte waren dagegen hierfür offensichtlich nicht verwendbar.

Unsere Erwartung hat sich in vollem Umfang bestätigt, wie es die nachstehenden Protokolle Nr. 2, Teil A, und Nr. 3, Teil A beweisen. Filtriert man Gemische abgestufter Konzentrationen von Sachs-Georgi-

Protokoll Nr. 2 (Serumüberschuß)

	Gemisch von			Prüfung nach der				Ergebnis:
				WaR.		SGR.		
				Zusatz von		Zusatz von		
	Extr.	Syphser. Fü.	Kompl.	Syphser.	Extr.	Syphser.	SG. Extrakt	
A	1:5	1:16	1:10	c	c	0	0	**neutral**
	1:45	1:5	1:10	c	+	0	+++	**Serum-überschuß**
B	1:5	1:16	0	c	c	0	0	**neutral**
	1:45	1:5	0	c	+	0	++++	**stärkerer Serum-überschuß**

Extrakt, Syphilisserum und Komplement nach der beschriebenen Technik, so ergeben die Filtrate der serumreicheren Gemische die Flockungsreaktion nur mit zugesetztem Sachs-Georgi-Extrakt, während die Filtrate der extraktreicheren Gemische nur mit zugesetztem Syphilisserum ausflocken. Diese Reaktionen verlaufen parallel mit den gleichzeitig angesetzten Reaktionen der Filtrate nach der oben beschriebenen Komplementbindungsmethode nach Wassermann.

Bei diesen Mengenverhältnissen erhält man demnach in den Filtraten sowohl bei der Prüfung mit der Komplementbindung nach Wassermann wie mit der Flockungsmethode nach Sachs-Georgi gleichlaufende Ergebnisse: Extrakt 1:5 + Syphilisserum 1:16 neutral: Extrakt 1:45 + Syphilisserum 1:5 Ueberschuß von Serum. Die gleichzeitig mit den unfiltrierten Gemischen der Reihe A ausgeführten Wassermann-Reaktionen waren positiv; die verwendeten Konzentrationen hatten also zur Komplementbindung ausgereicht.

Aendert man die Konzentrationen, so gelingt es im Filtrat anstatt des Ueberschusses von Syphilisserum einen solchen von Extrakt nachzuweisen (Protokoll Nr. 3, Teil A).

Protokoll Nr. 3 (Extraktüberschuß)

	Gemisch von			Prüfung nach der				Ergebnis:
				WaR.		SGR.		
				Zusatz von		Zusatz von		
	Extr.	Syphserum	Kompl.	Syphser. Me.	Extr.	Syphser. Me.	SG.-Extr.	
A	1:6	Ser. Eng. 1:8	1:10	+	c	++	0	Extraktüberschuß
A	1:6	Ser. Me. 1:16	1:10	+	c	++	0	desgl.
A	1:6	Ser. Grp. 1:16	1:10	+	c	+++	0	starker Extraktüberschuß
B	1:6	Ser. Eng. 1:8	0	+	c	++++	0	sehr starker Extraktüberschuß
B	1:6	Ser. Me. 1:16	0	+	c	+++	0	starker Extraktüberschuß
B	1:6	Ser. Grp. 1:16	0	+	c	+++	0	desgl.

Bei der Besprechung von Protokoll Nr. 1 hatten wir darauf hingewiesen, daß die Bindung von Extrakt und Syphilisserum bei Gegenwart von Komplement eine Verfestigung erfährt. Der gleiche Schluß muß aus den Protokollen Nr. 2 und 3 gezogen werden, wenn man jeweils die Reihe A (Gegenwart von Komplement) mit Reihe B (Fehlen von Komplement) vergleicht. Es ergibt sich also, daß ebenso wie bei der Wassermann-Reaktion die Anwesenheit von Komplement auch bei der Sachs-Georgi-Reaktion zur Verfestigung der Bindung führt, bzw. die Reversibilität der Bindung beeinträchtigt.

II.

Die Auffassung, daß das „Wassermann-Aggregat" durch geeignete Verfahren gespalten und die „Wassermann-Substanz" wieder

frei gewonnen werden könnte, suchte v. Wassermann (8) insbesondere durch seine 1922 gemeinsam mit Citron veröffentlichten Versuche über Filtration durch Kieselgur-imprägnierte Papierfilter zu belegen. Er schlug vor, dies Verfahren allgemein als „Bestätigungsreaktion" bei allen zweifelhaften Ergebnissen der Wassermann-Reaktion zu verwenden.

Wir haben bereits in unserer ersten Mitteilung (1923) gezeigt, daß eine solche praktische Verwendbarkeit nicht in Frage kommen kann, weil je nach dem zum Ansetzen der Wa.-R. verwendeten Verhältnis der Menge (bzw. der Wirksamkeit) des Extraktes und des Syphilisserums das nach dieser Anordnung gewonnene Filtrat bald nur mit Extrakt, bald nur mit Syphilisserum, bald mit keinem von beiden Komplementbindung ergibt. Trotzdem also sicher syphilitische Sera verwendet wurden, enthielt das Filtrat nur im 1. Fall die „Wassermann-Substanz", im 2. Falle enthielt es dagegen Antigen, im 3. Falle war es „neutral". Gerade die letzteren beiden Möglichkeiten werden am ehesten bei den schwach positiven Syphilisseren auftreten, also gerade da, wo eine „Bestätigungsreaktion" allein in Betracht kommt. Daß nach unseren Versuchsergebnissen auch die theoretischen Schlußfolgerungen, die v. Wassermann aus den soeben angeführten, 1922 mitgeteilten Kieselgurfiltrationen zieht, nicht sicher begründet sind, haben wir in unserer 1. Mitteilung eingehend besprochen.

In seiner kurzen Kritik unserer Arbeit (1924) geht v. Wassermann (9) auf diese unsere Versuche und Schlußfolgerungen nicht näher ein; er sucht die Richtigkeit seiner Auffassung nur zu beweisen durch seine erste, ursprüngliche Versuchsanordnung (7) aus dem Jahre 1921, die er später selber fallen gelassen hat, weil sie ihm zu umständlich erschien. Diese Anordnung hat er erst jetzt durch ein Protokoll belegt: die Methode bestand darin, daß er „zunächst das Aggregat durch Zusatz von destilliertem Wasser nach dem Vorgang von Meinicke ausfällte". Der Niederschlag wurde dann zentrifugiert, mehrmals mit destilliertem Wasser gewaschen, um jeden Rest von etwa noch anhaftendem Serum zu entfernen, darauf „durch eine 1,7proz. Kochsalzlösung in Lösung gebracht und mittels der de Haenschen Filter in seine Komponenten zerlegt." Wegen der Einzelheiten des Versuchs wird auf die betreffende Veröffentlichung (9) hingewiesen. Von Interesse ist aber das Ergebnis, das hier tabellarisch wiedergegeben wird.

	Wassermann-Reaktion ohne Antigen	Wassermann-Reaktion mit Antigen
1) Syphilisserum:		
Lösung des Niederschlags	++++	++++
Dieselbe, nach Filtration durch de Haen	0	++++
2) Negatives Serum:		
Niederschlag, in 1,7 % NaCl suspendiert	0	0
Die Suspension, nach Filtration durch de Haen	0	0

a) Leider enthält jedoch dies Protokoll keine Angaben, welches von den drei bekannten Verfahren der Meinickeschen Fällungsreaktion hier benutzt wurde. Das wäre aber von großer Wichtigkeit gewesen, denn diese Verfahren unterscheiden sich sehr wesentlich voneinander in ihren Ergebnissen, vergl. nachstehende tabellarische Uebersicht:

Die Modifikationen der Meinickeschen Fällungsreaktion.

M. R.	Serum	Extrakt	Zusatz von	Ergebnis: Flocken
Ia Ib	0,2 0,3	1,5 (1 : 12) 0,7	2,5 Aq. dest. 4,0 „ „	nur in negativen, nicht in syph. Seren
III	0,3	0,6 (1 : 8)	0,8 NaCl 2 %	nur in syph., nicht in neg. Seren
II	0,2	0,8 (1 : 8)	0	Flocken in syph. und neg. Seren; bei Digestion in 1,4—2,4 % NaCl sind die syph. Flocken unlöslich, die neg. Flocken löslich.

Da sowohl im positiven, wie im negativen Serum des in Rede stehenden Versuchs Flocken aufgetreten sind, scheint es auf den ersten Blick, als wäre die M.R.II verwendet worden. Indessen sind bei dieser die Flocken in Kochsalz löslich nur bei den negativen, unlöslich bei den syphilitischen Seren, während das v. Wassermannsche Protokoll ausdrücklich besagt: der Niederschlag des positiven Serums wurde in NaCl-Lösung suspendiert und gelöst, während beim negativen Serum nur die Suspendierung, nicht die Lösung des Niederschlags erwähnt wird. Hier scheint uns eine Unklarheit zu bestehen: da v. Wassermann diesen Versuch bei der nachfolgenden Filtration als Kontrolle verwendet, die doch nur dann eine solche vorstellen könnte, wenn die Flocken vorher gelöst wurden, hat er vielleicht nur versehentlich die Lösung der Flocken nicht erwähnt. Dann aber würden sich die positiven Sera von den negativen weder bei der Ausflockung noch bei der Lösung unterscheiden, sodaß man vom Begriff einer für die Lues charakteristischen Flockung abstrahieren muß. Wahrscheinlich ist also eine Abwandlung der ursprünglichen Meinickeschen Reaktion verwendet worden, die uns nicht geläufig ist.

b) Wenn wir aber anderseits das Protokoll so zu verstehen haben, daß die Flocken beim negativen Serum in NaCl-Lösung zwar suspendiert, aber nicht gelöst wurden, so stellt dieser Gegenversuch keinerlei Kontrolle zu dem Versuch mit dem positiven Serum dar. Wenn man nämlich einen Niederschlag von der Suspendierungsflüssigkeit trennen will, so braucht man nicht zuvor ein für ihn nicht wirksames Lösungsmittel auf ihn einwirken zu lassen, ehe er abfiltriert wird. Die Kardinalfrage ist hier die Spaltung oder Nicht-Spaltung durch ein physikalisches Verfahren, nämlich die Filtration. Der Filtration muß naturgemäß die Auflösung des Niederschlags vorangehen.

c) Ferner vermißt man in dem angeführten Protokoll die wichtigen Kontrollen mit Zusatz von Syphilisserum zu den Filtraten; denn diese müssen zeigen, ob das Filtrat frei von wirksamen Extraktbestandteilen ist (vgl. S. 440).

d) Aber selbst wenn alle diese Bedenken sich durch ausführlichere Mitteilung der Protokolle einfach aufklären sollten, würde noch ein letzter Einwand bestehen bleiben, der sich auf quantitative Verhältnisse gründet. Es ist nämlich noch keineswegs erwiesen, daß bei der Wa.-R. genau die gleichen Bestandteile miteinander in Reaktion treten, wie bei den verschiedenen Fällungs- und Trübungsreaktionen; lägen die Dinge wirklich so einfach, so würde es nicht eine so große Anzahl verschiedener Verfahren zu geben brauchen, es würde vor allem nicht

möglich sein, daß man bei ganz geringfügiger Aenderung des Verhältnisses von Serum, Extrakt und Wasser das eine Mal die Flocken beim syphilitischen, das andere Mal nur beim nicht syphilitischen Serum, ein drittes Mal bei beiden erhält (die verschiedenen Modifikationen der Meinickeschen Reaktion, vgl. vorstehende Tabelle). Experimentell gestützt wird unser Einwand durch die Untersuchungen Weißbachs, nach denen bei fraktionierter Ausfällung der Serumglobuline mit Ammonsulfat erst die Flockungsreaktion, dann die Wassermann-Reaktion verschwindet. Es erscheint uns daher keineswegs zulässig, die Komplementbindung bei der Wa.-R. mit der Flockenbildung bei der M.-R. gleichzusetzen, wenn wir auch einen gewissen inneren Zusammenhang zwischen beiden nicht bestreiten. v. Wassermann (7) hat selbst einen diesbezüglichen Hinweis gegeben, indem er im Anschluß an die Darlegung seiner Auffassung von der „Wassermann-Substanz" als Ambozeptor schreibt: „Sie (die Wassermann-Substanz) ist daher der Träger für jede bis heute bekannte Serodiagnostik der Syphilis. Der Unterschied besteht nur darin, daß zum Auslösen der Fällungsreaktion eine größere Menge von Globulin vorhanden sein muß, als das zum Eintritt der Wa.-R. erforderlich ist". In der Tat scheint es nach den neuesten Untersuchungen von R. Stern (6) sicher, daß die Reagine in der Euglobulinfraktion zu suchen sind. Andererseits kann v. Wassermann das, was er will, nur beweisen unter der Voraussetzung, daß für beide Prozesse — Flockung und Komplementbindung — quantitativ und qualitativ die gleichen Reaginmengen erforderlich sind: Würden nämlich z. B. in den Flocken der Meinicke-Reaktion mehr Reagine gebunden als bei der Komplementbindung, so müßten aus den Flocken (trotz des vorausgegangenen mehrmaligen Waschens) bei ihrer nachfolgenden Auflösung wieder mehr Reagine frei werden, als die nachher angesetzte Wa.-R. verbraucht; dann enthielte das Filtrat eben nur den Ueberschuß, die Differenz zwischen den Reaginen, die zur Flockung, und denen, die zur Komplementbindung verbraucht werden. Es wäre dann dieser Ueberschuß, der mit neu hinzugesetztem Extrakt die positive Komplementbindung ergibt.

e) Wenn v. Wassermann (siehe Protokoll) mit den gewaschenen und nachher gelösten Flocken, die aus den positiven Seren stammen, vor der Filtration bei erneutem Zusatz von Komplement, aber ohne Zusatz von Antigen wieder eine positive Wa.-R. erhält, so ist daraus nur zu folgern, daß durch die eingelegte Ausflockung und Lösung das „Wassermann-Aggregat" in seinem normalen Verhalten nicht gelitten hat. Denn man kann eine positive Wa.-R. auch unter normalen Verhältnissen, wenn die Komplementbindung vollständig war, nach Abzentrifugierung der Hammelblutkörperchen ohne erneuten Antigenzusatz in den meisten Fällen wiederholen, ein Beweis dafür, daß das zuerst zugefügte Komplement nicht zur Sättigung des gesamten „Wassermann-Aggregates" ausgereicht hat.

Wenn also v. Wassermann (siehe Protokoll) nach der Filtration bei Zusatz von Antigen eine positive Reaktion, ohne Zusatz von Antigen eine negative Reaktion erhält, so spricht das — nach Fortfall der Bedeutung der v. Wassermannschen Kontrolle mit normalem Serum — vielmehr für unsere Auffassung des Vorganges als für die seinige, nämlich dafür: daß das Aggregat im Filter zurückgeblieben ist und daß der — ungeachtet des mehrmaligen Waschens mit destilliertem

Wasser — aus den Flocken stammende Serumüberschuß das Filter passiert hat und mit dem neu hinzugesetzten Antigen wiederum in positivem Sinne reagiert.

Die Flockung und Lösung ist unseres Erachtens ein nebenher laufendes, an sich für den Ausfall der Wa.-R. belangloses Geschehen, das aber der Klarheit und Durchsichtigkeit des Versuches beträchtlich schadet. Daher ist diese von v. Wassermann ursprünglich angewandte Methodik zur Entscheidung der Frage, ob es sich bei der Filtration um eine Spaltung des Aggregates oder einen Serumüberschuß handelt, nicht geeignet. Wohl aber ist hierfür geeignet die zweite Methode v. Wassermanns, bei der er das „Wassermann-Aggregat", unter Weglassung der ganz unnötigen Flockung, unmittelbar durch Kieselgur filtriert. Da wir mit dieser zweiten Methode gearbeitet haben, die wir seinerzeit für unsere Untersuchungen auch modifizierten, können wir jetzt nicht nur unsere sämtlichen damals mit ihr erhaltenen Ergebnisse und Schlußfolgerungen aufrecht erhalten, sondern sie dahin ergänzen: **Auch mit der ursprünglichen Versuchsanordnung hat v. Wassermann die Möglichkeit, das Syphilisserum-Antigen-Aggregat wieder in seine Komponenten zu zerlegen, zweifelsfrei nicht nachgewiesen.**

Zusammenfassung.

1) In Gemischen von Extrakt und Syphilisserum tritt bei Gegenwart von Komplement eine Verfestigung der Bindung ein, die sich sowohl in der Wassermann-Reaktion wie in der Sachs-Georgischen Flockungsreaktion nachweisen läßt. — 2) Die Einwände v. Wassermanns gegen unsere früher erhobenen Versuchsergebnisse werden widerlegt. Damit wird bewiesen, daß die von ihm zur Klärung zweifelhafter Ergebnisse bei der WaR. vorgeschlagene „Bestätigungsreaktion" für die Praxis nicht verwertbar ist.

Literatur.

1) Berczeller, Biochem. Ztschr. Bd. 83. 1917. S 315. — 2) Hecht, Ztschr. f. Immunitätsf. Bd. 34. 1916. S. 258. — 3) Nathan, Ebenda. Bd. 26. 1917. S. 154; Klin. Woch. 1922. S. 1999. — 4) Neukirch, Ztschr. f. Immunitätsf. Bd. 29. 1920. S. 177. — 5) Prausnitz, Carl u. Stern, Margarete, Dies. Centralbl. Abt. I. Orig. Bd. 90. 1923. S. 246. — 6) Stern, R., Klin. Woch. 1923. S. 1411; Biochem. Ztschr. 1924. Bd. 144. 3. — 7) v. Wassermann, Berl. klin. Woch. 1921. S. 193. — 8) Ders. u. Citron, Klin. Woch. 1922. S. 1101. — 9) Ders., Dies. Centralbl. Abt. I. Orig. Bd. 92. 1924. S. 317.

Variola-Vakzinestudien. I.

Zur Technik der Herstellung von Dauerzupfpräparaten des vakzinierten Kaninchenhornhautepithels.

[Aus dem Hygienischen Institut der Universität Rostock (Direktor: Prof. Dr. v. Wasielewski).]

Von Dr. med. **Blunck,**

früher Medizinalpraktikant am Hygienischen Institut Rostock.

Zum Nachweis der Guarnierischen Körperchen sind die verschiedensten Methoden versucht worden. Man muß unterscheiden, ob Präparate zum Studium

der Natur der Guarnierischen Körperchen, oder zu diagnostischen Zwecken hergestellt werden sollen. An letztere können natürlich geringere Ansprüche gestellt werden, als an erstere. Die Hauptsache ist, daß die Guarnierischen Körperchen nach ihrem Aussehen, ihrer Menge und Lagerung als solche erkannt werden, denn ihr Auftreten bedeutet unzweifelhaft, daß eine Infektion mit Variola oder Vakzine erfolgt ist. Zum Nachweis von Variolavirus wurde die Hornhautimpfung schon 1894 von Monti benutzt. Auf die Brauchbarkeit des Guarnierischen Impfexperiments zu diagnostischen Zwecken wies zuerst 1897 Salmon hin, während E. und L. Pfeiffer 1900 als erste durch die Hornhautimpfung eine klinisch zweifelhafte Pockendiagnose bestätigen konnten. In gleichem Sinne äußerten sich Wasielewski (1901, 1905) und Jürgens (1904 und 1905). Für die Technik der Ausführung des Guarnierischen Impfexperiments bestimmend war zunächst seine Verwendung für Untersuchungen über die Natur des Vakzineerregers. Aber bei Reihenuntersuchungen zur Feststellung der Fortpflanzungsfähigkeit des Vakzineerregers im Hornhautepithel des Kaninchens ergab sich schon die Notwendigkeit, durch eine Vereinfachung der Technik den Nachweis des Vakzineerregers im Hornhautepithel zu erleichtern. So gab v. Wasielewski (1901) an, daß er abgeschabtes Hornhautepithel in Essig- oder Osmiumsäure regelmäßig untersucht habe und in kürzester Zeit feststellen konnte, ob eine typische Entwicklung von Guarnierischen Körperchen stattgefunden hatte. Nach diesen Versuchen, deren Anwendbarkeit für die Pockendiagnose v. Wasielewski schon 1901 betont hatte, kam die mikroskopische Diagnose, insbesondere nach den Veröffentlichungen von Jürgens aus den Jahren 1903—1905 immer mehr in Aufnahme. Später hat man eine Zeitlang ganz von dem mikroskopischen Nachweise der Vakzinekörperchen abgesehen. Man begnügte sich vielfach mit der Darstellung der durch das Variolavakzinevirus bewirkten mikroskopischen Veränderungen mit Hilfe des von Paul seit 1914 empfohlenen Sublimatbades. In den letzten Jahren wird aus unten näher zu erörternden Gründen auf den mikroskopischen Nachweis der Guarnierischen Körperchen wieder großes Gewicht gelegt, und zwar arbeitete man vorzugsweise mit der vitalen oder „Frischfärbung" des abgeschabten Hornhautepithels (Ungermann und Zülzer, 1919, 1920). Erst 1919 versuchte Hesse die Herstellung von Dauerpräparaten des einfach abgeschabten Epithels. Im Winter 1919/20 bemühte ich mich auf Veranlassung des Herrn Prof. v. Wasielewski, brauchbare Dauerpräparate von zerzupftem Hornhautepithel herzustellen. Die hierbei gesammelten Erfahrungen wurden in einer Doktordissertation niedergelegt, die aus äußeren Gründen nicht im Druck erscheinen konnte. Da inzwischen keine wesentlichen Fortschritte in dieser Methodik zu verzeichnen sind, sollen diese Erfahrungen hier kurz beschrieben werden.

Bei allen Untersuchungen abgeschabten und nicht in Schnitte zerlegten Hornhautepithels wird immer ein gewisses Geschick Voraussetzung bleiben. Die Hauptsache ist, die Epithelfetzen möglichst in dünner Schicht auszubreiten, so daß nach Möglichkeit die Entstehung dicker Klumpen von Epithelzellen auf den Deckgläschen oder Objektträgern vermieden wird, da diese sich ungleichmäßig färben, und die Durchmusterung der Präparate erschweren. Denn wenn man sich mit progressiven Färbemethoden begnügt, werden entweder die einfachen Zellagen genügend gefärbt, während die verklumpten Stellen die Farbe überhaupt noch nicht angenommen haben, oder die dünneren Stellen werden überfärbt, während die dickeren unübersichtlich werden. Für den Nachweis der Vakzinekörperchen muß aber eine Durchfärbung auch der dickeren Klumpen angestrebt werden, um das ganze abgeschabte Material durchsuchen zu können, da andernfalls Epithelherde mit Vakzinekörperchen übersehen werden können. Der schwierigste Teil der ganzen Untersuchung, welches Verfahren man auch zur weiteren Verarbeitung wählen mag, ist die Ausbreitung des Epithels auf dem Deckgläschen oder Objektträger. Zunächst erscheint es am zweckmäßigsten, die abgeschabten Epithelfetzen in einem Tropfen Kochsalzlösung auszubreiten, wie es bisher von den Untersuchern empfohlen wurde. In der Tat ist dies recht bequem und führt auch schnell zum Ziele; doch ergibt sich dann später bei der Fixierung eine große

Schwierigkeit. Die einzelnen Fetzen haften dann nicht mehr fest genug an der Unterlage, so daß bei den folgenden Manipulationen ein Teil des Epithels wieder verloren geht. Dies scheint auch ein Nachteil des Hesseschen Verfahrens (5) zu sein. Bei der von ihm angegebenen Art der Verarbeitung kann man nur mit größeren Epithelfetzen arbeiten, während die große Menge der kleineren Zellgruppen verloren geht. Gerade die erkrankten Zellen aber lösen sich besonders leicht aus dem Zellverbande. Es ist daher von großem Vorteil für die Nutzbarmachung all dieser kleinen Zellgruppen, wenn man das Epithel, so wie man es auf der Lanzette hat, mit einer Präpariernadel beim Abstreifen nachhelfend, ohne Flsüsigkeitszusatz auf Deckgläschen bringt. Wenn man schnell genug arbeitet, bleiben die Epithelzellen immer noch feucht genug, um sie ausbreiten und zerzupfen zu können. Wenn man dann die Deckgläschen in die fixierende Flüssigkeit bringt, haften selbst einzelne Zellen durch das gerinnende Eiweiß, das nicht durch die Kochsalzlösung verdünnt ist, fest auf der Unterlage an. Zerzupft man hinreichend gründlich und doch rasch und verteilt die Zellgruppen unter dem Präpariermikroskop, so kann man damit rechnen, daß die Fixierungs- und Färbungsflüssigkeiten genügend eindringen, und daß durch geeignete Differenzierung auch die kleinsten Klumpen so weit wieder aufgehellt werden, daß ihre Durchmusterung möglich ist. Bewahrt man nun diese Deckgläschen mit dem frisch abgeschabten Epithel vor der Verarbeitung einige Zeit auf, so leiden die Zellen auch in der feuchten Kammer etwas durch Austrocknen, und vor allem wird die spätere Ausbreitung erschwert. Es ist daher zweckmäßig, nicht gleich das ganze Hornhautepithel vom Auge abzuschaben und zu verarbeiten, wenn man mehrere Präparate anfertigen will, um sich gegen unvorhergesehene Zufälligkeiten zu schützen. Besonders scheint dies Verfahren bei wissenschaftlichen Versuchen vorteilhaft. Weiter ist es wesentlich, das Auge vor der Epithelabschabung mit physiologischer Kochsalzlösung gut abzuspülen, denn Verunreinigungen und Schleim können das mikroskopische Bild sehr stören, unter Umständen sogar für einen weniger Erfahrenen Guarnierische Körperchen vortäuschen. Die Kochsalzlösung muß gegebenenfalls vor der Abschabung des Epithels wieder etwas abgesogen werden, damit die abgeschabten Fetzen nicht fortschwimmen, sondern an der Lanzette haften bleiben.

Zu allen diesen Verrichtungen ist natürlich eine sachgemäße Lagerung des Tieres Vorbedingung, um ruhiges Arbeiten zu ermöglichen. Die Tiere werden am einfachsten und schonendsten in einen kleinen Sack gesteckt, der um den Hals so weit zugezogen wird, daß ein freies Bewegen der Vorderfüße verhindert wird. Außerdem kann das Tier dann noch mit einer Binde festgewickelt werden, so daß ein Ausweichen nicht möglich ist.

Die besten Bilder gab beim Vorhandensein von Guarnierischen Körperchen die Verarbeitung des abgeschabten Epithels nach Romanowsky-Giemsas Vorschriften. Es eignet sich allerdings auch nur für gut ausgebreitete, nicht zusammengerollte Epithelfetzen, da „Klumpen" von Zellen nicht durch Differenzierung genügend aufgehellt werden können. Das abgeschabte Epithel wurde zunächst nach Giemsas für Ausstriche angegebenen Vorschriften verarbeitet. Die Deckgläschen, auf denen das abgeschabte Epithel ausgebreitet war, wurden 10 Min. mit Sublimatalkohol fixiert, darauf 10 Min. mit der von Giemsa angegebenen Jodkali-Jodalkohollösung behandelt, dann abgewaschen, 5 Min.

in $^1/_2$proz. Natriumsulfat, 5 Min. in fließendem Wasser gelassen, dann 20 Min. mit Giemsa-Lösung, 1 Tropfen auf 1 ccm Wasser, gefärbt und durch die Azeton-Xylolreihe nach genügender Differenzierung unter mikroskopischer Kontrolle in Zedernöl eingebettet. Dieses Verfahren läßt die Guarnierischen Körperchen wenig scharf hervortreten; stärkere Kontraste erhält man, wenn man nach der Färbung in Alkohol differenziert und durch aufsteigenden Alkohol in Kanadabalsam überführt. Die Guarnierischen Körperchen erscheinen dann dunkelblaurot bis schwarz in dem hellblau bis rot, je nach dem Grade der Differenzierung verschieden gefärbten Gewebe. Wegen Mangels an Versuchstieren konnten diese Färbungen vom Verfasser nur einige Male durchgeführt werden. Die Uebersichtlichkeit der damit erreichten Bilder ist hervorragend.

Ein einfacheres, zu diagnostischen Zwecken für größere Untersuchungsreihen vielleicht geeigneteres Verfahren weicht von den bisher angewandten Methoden ab. Diese Methode gestattet ein schnelleres und einfacheres Arbeiten, auch ist die Uebersicht über dickere Klumpen von Epithelfetzen eine bessere. Als Fixationsmittel ist Formaldehyd gewählt. Zur Schnellfärbung und raschen Fertigstellung von Dauerpräparaten nach dieser Fixierung sind unter Zuhilfenahme des Gefriermikrotoms verschiedene Verfahren angegeben worden. Ein dem von Pick angegebenen ähnliches kann man auch zur Verarbeitung des abgeschabten Hornhautepithels, ohne es in Schnitte zu zerlegen, verwenden. Wenn man die Epithelfetzen vor dem Fixieren vor dem Eintrocknen schützt und das Präparat recht schonend durch aufsteigenden Alkohol zum Xylol leitet, bekommt man befriedigende Zellbilder. Als Farbstoff eignet sich besonders das Thionin, denn die Guarnierischen Körperchen haben zum Thionin eine ähnliche Affinität wie zum Safranin. Sie nehmen den Farbstoff energisch an und halten ihn auch bei der Differenzierung recht fest. Außerdem hat das Thionin die Eigenschaft, geeignetes Material metachromatisch zu färben. Entfernt man z. B. von der Epithelabschabung den Schleim nicht genügend, so färbt er sich im Gegensatz zu dem blauen Gewebe rot. So werden auch die Guarnierischen Körperchen in den meisten Präparaten metachromatisch gefärbt. Während die Zellkerne sich blau bis blaugrün färben, nehmen die Guarnierischen Körperchen häufig einen violetten bis roten Farbenton an. Das Thionin wird nicht in einfacher wässeriger Lösung benutzt, sondern, um Fixierung und Färbung zu vereinigen und dadurch den ganzen Prozeß zu vereinfachen und abzukürzen, in 4proz. Formaldehyd gelöst. Am besten bewährte sich eine $^1/_2$proz. Farblösung. Wenn man mit dieser Mischung einige Minuten gefärbt und dann in 80proz. Alkohol genügend differenziert hat, zeichnen sich die Guarnierischen Körperchen durch den oben beschriebenen dunkleren Farbenton vor dem schwächer blau gefärbten Gewebe aus und können schnell und leicht aufgefunden werden.

Das Deckgläschen mit dem genügend zerzupften und ausgebreiteten Material wird auf $^1/_2$ Min. in eine 4proz. Lösung von Formaldehyd und dann auf etwa 10 Min. in die $^1/_2$proz. Lösung von Thionin in 4poz. Formaldehyd gebracht; dann etwa $^1/_2$ Min. in Wasser abgespült und möglichst schonend durch langsam aufsteigenden Alkohol bis in 80proz. gebracht. Alle diese Prozeduren werden zweckmäßig in kleinen Blockschälchen vorgenommen. Das Differenzieren kann man bei einiger Uebung ebenfalls in Blockschälchen unter dem Mikroskop vornehmen,

doch ist es zweckmäßiger, hierzu eine Färbebrücke zu verwenden, wie sie in der Arbeit von v. Wasielewski und Kühn (1914) angegeben ist. Man braucht sich dann nicht mit einem Uebersichtsbild zu begnügen, sondern kann den Gang der Differenzierung mit starkem Trockensystem oder mit der Immersionslinse verfolgen und dabei schon, wie übrigens an den schwächer gefärbten Stellen schon gleich nach der Färbung in Wasser, Guarnierische Körperchen feststellen. Je schonender man den Uebergang vom Wasser zum Alkohol und das Hinaufführen durch die Alkoholreihe wählt, um so schönere Zellbilder erhält man. In jedem Präparat werden immer noch viel verzerrte Zellen sein, doch liegt das am Ausbreiten und läßt sich auch bei Verwendung von Kochsalzlösung nicht vermeiden. Wenn an den Stellen mittlerer Dicke die Kerne nur noch schwach gefärbt sind und vor allem das Protoplasma entfärbt ist, ist die Differenzierung, die etwa 10 Min. in Anspruch nimmt, beendet. Das Deckgläschen kommt kurz über 96proz. und absoluten Alkohol in Xylol und wird in Kanadabalsam eingebettet. Es kann nun sofort durchmustert werden.

Die Haltbarkeit der Präparate scheint befriedigend zu sein, jedenfalls genügt sie für diese diagnostischen Zwecke, da sie nach $3^1/_2$ Mon. noch keine wesentliche Veränderung in der Farbe zeigen.

Man kann von einer Hornhaut auf die vorstehend beschriebene Weise, indem man das Epithel verteilt, mehrere Präparate anfertigen. Die Herstellung des fertigen Präparates nimmt etwa $^1/_2$ Std. in Anspruch, und es bedarf keiner weiteren Uebung, um zufriedenstellende Ergebnisse zu erzielen. Auch an den dickeren Stellen kann man das ganze Präparat durchmustern und findet es oft wie übersät mit den dunklen Guarnierischen Körperchen, deren Erkennung meistens so leicht ist, daß sie selbst dem Ungeübten auffallen müssen.

Wenn die vorstehend beschriebenen Methoden auch nicht berufen sind, unser Wissen über das Wesen des Variolavakzineerregers zu fördern, so erleichtern sie doch den Nachweis der Guarnierischen Körperchen und vermeiden das zeitraubende Schnittpräparat bei diagnostischen Untersuchungen. Die Formalin-Thioninmethode stellt keinerlei Anforderungen an besonders technisches Können, so daß sie wohl geeignet ist, auch außerhalb der großen Untersuchungsanstalten Verwendung zu finden. Man hat nur nötig, ein Auge zu impfen und braucht das Tier nicht zu töten. Meistens verheilt die Hornhaut so, daß man nach kurzer Zeit höchstens eine leichte Hornhauttrübung, oft auch gar keine Folgen der Impfung sieht. Augenerkrankungen, die zum Verlust des Auges führen, werden gewöhnlich nicht beobachtet.

Literaturnachweis.

Brinkerhoff, W. R., and Tyzzer, E. E., Studies upon experimental variola and vaccina in quadrumana. With an introduction by W. T. Councilman. (The Philipp. Journ. Science. I. 1906., No. 3.) — Gins, Erfahrungen mit der experimentellen Pockendiagnose nach Paul. (Ibid. 1916. H. 34). — Guarnieri, Richerche sulla patogenesi ed etiologia dell'infezione vaccinica et variolosa. (Arch. Science Med. Torino e Palermo. Vol. 16. 1892.) — Hesse, Zur Färbung der Guarnierischen Körperchen. (Berl. klin. Woch. 1919. H. 44.) — Jürgens, Die ätiologische Begründung der Pockendiagnose. (Dtsch. med. Woch. 1904. H. 45.) — Ders., Ueber die diagnostische und ätiologische Bedeutung der Variolakörperchen. (Charité-Annal. Jahrg. 29.) — Ders. Vortrag in der Sitzung der Gesellschaft der Charitéärzte vom 13. 2. 1905; Berliner klin Wochenschrift. 1905. Heft 11.) — Monti, Sull'eziologia del vaiolo e sulle localizzazioni del virus vaiolos. (Atti del XI. congresso med. internaz. Roma

1894. p. 128.) — Paschen, Was wissen wir über den Vakzineerreger. (Münch. med. Wochenschrift. 1906. Nr. 49.) — Paul, Ueber einige notwendige Ergänzungen der gegenwärtig üblichen Art der Blatternerhebung. (Der Amtsarzt. 1914. Juli/August.) — Ders., Zur Differentialdiagnose der Variola und der Varizellen. Die Erscheinungen an der variolierten Hornhaut des Kaninchens und ihre frühzeitige Erkennung. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 75. 1915. — Ders., Zur histologischen Technik des Cornealversuches bei der Pockendiagnose. (Dtsch. med. Woch. 1917. Nr. 29.) — Ders., Entwicklungsgang der Pockenepitheliose auf der geimpften Kaninchenhornhaut. (Ibid. 1917. Nr. 45.) — Ders., Kreistagung der Vorstände der deutschen staatlichen Impfanstalten am 5./6. 9. 1918. (Hyg. Rundsch. 1919.) — Pfeiffer, E., Untersuchungen über die Dauer des Schutzes der Schutzpockenimpfung. (Vierteljahresschr. f. gerichtl. Med. Bd. 19.) — Pfeiffer, L., Ueber die frühe mikroskopische Differentialdiagnose zwischen Variola und Varizellen. (Ber. über die Tätigk. d. Anstalt f. Gewinnung animaler Lymphe in Weimar 1899.) — Salmon, Recherches sur l'infection dans la vaccine et la variole. (Ann. Instit. Pasteur. T. 11. 1897. No. 4.) — Ungermann u. Zülzer, Beiträge zur experimentellen Pockendiagnose, zur Histologie des cornealen Impfeffekts und zum Nachweis der Guarnierischen Körperchen. (Arb. aus d. Reichsgesundheitsamt. Bd. 52.) — Voigt, Referat über eine Arbeit Pröschers. (Hyg. Rundsch. 1916. S. 330.) — v. Wasielewski, Beiträge zur Kenntnis des Vakzineerregers. (Zeitschr. f. Hyg. 1901. H. 38.) — Ders. u. Kühn, Untersuchungen über Bau und Teilung des Amöbenkerns. (Zool. Jahrb. Abt. f. Anat. u. Ontogenie d. Tiere. Bd. 38. 1914. H. 2.)

Ein neuer Nährboden zur Kultivierung der Spirochaete Obermeieri.

[Aus dem Bakteriologischen Institut der Universität zu Kasan (Direktor: Prof. W. Aristowsky).]

Von Prof. **W. Aristowsky** und Assistent **R. Hoeltzer.**

Im Jahre 1920 wurden in unserem Laboratorium die ersten günstigen Versuche der Kultivierung der Spirochaete Obermeieri direkt aus dem Blute des Kranken angestellt, und seit dieser Zeit wird die Kultur dieser Spirochäten bis jetzt fortgeführt. Vermittels der früher von uns publizierten Methode ist es uns gelungen, im Laboratorium in vitro im Laufe von ungefähr 2 Jahren einen Stamm fortzuzüchten, der 257 Generationen durchgemacht hat und welcher durch Zufall zugrunde ging (Verunreinigung des Serums mit fremden Bakterien, welches einen Teil unseres Nährbodens darstellt). Obwohl unsere Methode es erlaubt, in vitro den Spirochätenstamm in unendlicher Anzahl von Generationen zu erhalten, leidet sie doch noch an Kompliziertheit, wodurch ein täglicher großer Zeitverlust entsteht durch Uebersicht der Kulturen und Ueberimpfungen auf frischen Nährboden aus einer ganzen Reihe von Röhrchen.

Wir haben es uns daher zur Aufgabe gestellt, bei unserer ursprünglichen Methode Veränderungen durchzuführen, die einerseits die Pflege der Kulturen und die Technik der Ueberimpfungen vereinfachen, und andererseits die Bedingungen des Wachstums und der Vermehrung der Spirochäten verbessern. Dazu wurden wir noch von dem Umstande veranlaßt, daß die Methode von Ungermann, welche in Deutschland gute Erfolge ergibt (Manteufel, Illert), bei uns bei den Versuchen, unseren Laboratoriumstamm auf den Ungermann-Nährboden

überzuführen, unseren auf sie gesetzten Erwartungen durchaus nicht entsprach. Näheres über diese Frage wird in nächster Zeit von Dr. Hoeltzer veröffentlicht werden. Der Zweck der gegenwärtigen Mitteilungen ist es, die Resultate zu veröffentlichen, die wir bei den Versuchen zur Verbesserung und Vereinfachung unserer Methode erhalten haben.

Vor allen Dingen bemühten wir uns, festzustellen, welchen Einfluß auf die Entwicklung der Spirochätenkultur die Ueberschichtung des Nährbodens mit flüssigem Paraffinöl hat, eine Methode, die so oft von verschiedenen Autoren bei der Spirochätenkultivierung angewendet wird (Nogouchi, Ungermann, Kliegler u. Robertson u. a.). Die Anwendung des Paraffinöls bei unserer ursprünglichen Methode hatte keinen wesentlichen Einfluß auf die Spirochätenentwicklung. Andererseits bemerkten wir, daß die Ueberschichtung mit Paraffinöl ohne Zweifel die Entwicklung in günstigem Sinne beeinflußt, wenn man den Nährboden mit einem Stückchen gekochten Hühnereiweiß mit unverdünntem Pferdeserum bereitet, aber nicht mit verdünntem, wie wir es früher gewöhnlich getan haben. Auf einem solchen Nährboden (frisches Pferdeserum — Stückchen Hühnereiweiß — Paraffinölüberschichtung) entwickeln sich die Spirochäten reichlicher und bleiben viel längere Zeit im Brutschrank bei 35° C lebensfähig, als in Kulturen auf demselben Nährboden ohne Paraffinöl, oder auf einem Nährboden mit verdünntem Pferdeserum. Zuweilen, aber lange nicht immer, gelang es uns bei diesen Bedingungen, außerordentlich reiche Spirochätenkulturen, die wir früher nicht erzielten, zu bekommen.

Infolge der erhaltenen Resultate hofften wir, bei Benutzung dieses Nährbodens unsere ursprüngliche Methode in dem Sinne zu verändern, daß der Wechsel der Nährböden (Nährboden Nr. 1 und Nr. 2) ausgeschlossen wurde und man sich zur Erhaltung des Spirochaetenstammes in vitro auf Ueberimpfungen nur mit einem veränderten Nährboden beschränken könnte. Bald aber überzeugten wir uns bei diesen Versuchen, daß man auch unter diesen Bedingungen nur eine beschränkte Reihe der Generationen erhält, und daß es notwendig ist, von Zeit zu Zeit die Kultur durch den Nährboden Nr. 1 zur Erhaltung des Stammes für die folgenden Generationen durchzuführen.

Deshalb haben wir weiter versucht, unseren Nährboden dadurch zu verändern, daß wir das Stückchen Hühnereiweiß oder das Blutgerinnsel durch Stückchen von anderen Organen und Gewebe ersetzten. Wir wollen uns nicht bei den Einzelheiten dieser Beobachtungen aufhalten, sondern nur betonen, daß die Erfolge, die wir durch den Ersatz des Hühnereiweiß durch ein Stückchen Gehirngewebe erhalten haben, sich als so befriedigend erwiesen, daß wir jetzt unsere ursprüngliche Methode ganz aufgegeben haben.

Der Nährboden, den wir jetzt benutzen, wird von uns auf folgende Weise zubereitet: Gehirn von Kaninchen oder von Rind (das letztere erhalten wir aus Fleischhandlungen) wird in kleine Stückchen von 0,5—1 ccm zerschnitten, in Röhrchen verteilt, und die letzteren werden mit einigen Kubikzentimetern physiol. Kochsalzlösung gefüllt, um dann im Autoklaven 15 Min. lang bei 120° C sterilisiert zu werden. Vor der Beimpfung wird die Flüssigkeit aus den Röhrchen ausgegossen und in das Röhrchen, welches auf dem Boden ein steriles Stückchen des Gehirns enthält, werden 8 ccm frischen Pferdeserums zugefügt und beimpft. Gewöhnlich setzen wir dem frischen Nährboden 0,5—1 ccm

Kultur hinzu, worauf der flüssige Nährboden mit Paraffinöl überschichtet wird. Die Röhrchen werden im Brutschrank bei 35° C gehalten.

Auf diesem Nährboden entwickelt sich die Spirochaete Obermeieri viel reichlicher, als auf den früher von uns hergestellten. Von besonderem Wert ist aber der Umstand, daß es bei diesem Nährboden nicht notwendig ist, die Kulturen periodisch auf anderen Nährböden durchzuführen.

Unsere Versuche zeigten, daß man unter diesen Bedingungen den Spirochätenstamm in vitro scheinbar in unbegrenzten Generationen erhalten kann und bei den Ueberimpfungen der Kulturen nur mit diesem neuen Nährboden auskommt. Dafür spricht noch die Tatsache, daß wir jetzt in unserem Laboratorium eine Spirochätenkultur haben, die schon 60 Generationen auf diesem Nährboden ohne Passage durch andere Nährböden durchgemacht hat. Eine solche Zahl fortwährender Generationen auf den vorigen Nährböden ohne periodisches Passieren auf dem Nährboden Nr. 1 und Nr. 2 haben wir noch niemals bekommen.

Die Entwicklung der Kultur an einzelnen Tagen erfolgt im allgemeinen auch ebenso wie auf unseren früheren Nährböden, nur mit dem Unterschiede, daß man unvergleichlich reichere Kulturen erhält und daß dieselben viel längere Zeit lebensfähig bleiben.

Die Ueberimpfungen auf frische Nährböden machen wir gewöhnlich aus 48 Std. alten Kulturen, und nur selten, je nach der Geschwindigkeit der Kulturentwicklung, nehmen wir zu den Ueberimpfungen 24- oder 72stünd. Kulturen. Nach 2—3tägigem Aufenthalte der Kulturen im Brutschrank können die Röhrchen in der Kälte aufbewahrt werden, wo die Kulturen wenigstens 2 Wochen lebensfähig und zu Ueberimpfungen brauchbar bleiben können. Genauere Beobachtungen haben wir noch nicht gemacht.

Versuche, die wir mit Nährböden ohne Paraffinölüberschichtung gemacht haben, gaben uns weniger befriedigende Resultate. Unter diesen Bedingungen entwickeln sich die Spirochäten zwar oft auch sehr reichlich, aber die Resultate sind weniger regelmäßig, und außerdem beginnt die Degeneration viel früher, als in den mit Paraffinöl überschichteten Kulturen.

Ferner versuchten wir, das Pferdeserum durch inaktiviertes Kaninchenserum zu ersetzen. Auf diese Möglichkeit des Ersatzes von Pferdeserum durch Kaninchenserum haben wir schon in unserer ersten Arbeit über Kultivierung der Spirochaete Obermeieri hingewiesen (Aristowsky, Kas. Med. Journ. 1921. Nr. 1). Wie damals haben wir auch besonders jetzt (bei Benutzung des Gehirngewebes) keinen Vorzug dabei gesehen. In unseren früheren Versuchen, wo wir inaktiviertes Kaninchenserum anstatt Pferdeserum im Nährboden mit gekochtem Hühnereiweiß benutzten, bekamen wir Kulturen, die nach ihrem Reichtum an Spirochäten keinen Unterschied gegenüber den Kulturen auf entsprechendem Nährboden mit Pferdeserum hatten. Illert, welcher 1923 dem Wesen nach denselben Nährboden (Hühnereiweißserumnährboden), nur mit anderer Konzentration des Kaninchenserums und mit Paraffinölüberschichtung angewendet hatte, bekam auch üppige Kulturen, die bedeutend üppiger als die auf dem Nährboden nach Ungermann waren. Dagegen gab uns der Ersatz des Pferdeserums im Nährboden mit Gehirngewebe durch Kaninchenserum im Vergleich mit dem Nährboden mit Pferdeserum viel schlechtere Resultate, sowohl

bezüglich der Regelmäßigkeit als auch bezüglich des Spirochätenreichtums der Kulturen. Wir bekamen den Eindruck, daß bei dem Ersatz des Hühnereiweißes oder Blutgerinnsels durch ein Stückchen Gehirngewebe in dem aus Kaninchenserum vorbereiteten Nährboden die Bedingungen der Spirochätenentwicklung sich sogar verschlechtern und in scharfem Kontrast mit den Beobachtungen über den Pferdeserumnährboden stehen.

Auf diese Weise haben wir bei Kultivierung unseres Laboratoriumstammes der Spirochaete Obermeieri die besten Resultate mit dem Nährboden aus frischem Pferdeserum (8 ccm) mit Zusatz von sterilisierten Stückchen Gehirngewebe vom Kaninchen oder Rinde bekommen. Wenn auch die Ueberschichtung des Nährbodens mit Paraffinöl für die Spirochätenentwicklung nicht notwendig ist, verbessert sie doch die Bedingungen des Wachstums und der Erhaltung der Kulturen. Erwähnt sei noch, daß das Pferdeserum frisch und nicht fett sein muß. Gewöhnlich wird das Pferd am Vorabende und bis zur Blutentnahme am nächsten Tage nicht gefüttert. Das erhaltene Blut wird auf 2 Std. in den Brutschrank und dann an eine kühle Stelle gestellt. Sobald sich eine genügende Menge Serum gebildet hat, wird es abgenommen, und zwar, wenn möglich, am selben Tage, jedenfalls aber nicht später als am folgenden. Nach den unten erwähnten Erwägungen wird das in große Röhrchen abgefüllte Serum mit Paraffinöl überschichtet und in diesem Zustande an einer kühlen Stelle aufbewahrt. Größtenteils bedienen wir uns während 1 Woche dieses Serums, worauf wieder frisches Serum mittels neuer Blutentnahme genommen wird. Jedoch ist es besser, möglichst kürzere Zeiträume (3—4 Tage) die Blutentnahme von den Pferden auszuführen und das Serum zu gewinnen. Zu bemerken ist noch, daß wir zuweilen Pferde zu unserer Verfügung hatten, deren Serum für die Spirochätenzüchtung ungeeignet war. So z. B. hat von 4 Pferden, die in letzter Zeit von uns untersucht worden waren, das eine ungeeignetes Serum gegeben. Die Ursache dieser Erscheinung ist uns nicht näher bekannt. Jedenfalls trifft man aber solche Pferde seltener, als solche, welche ein vollkommen geeignetes Serum geben. Zur Serumgewinnung können junge Füllen, nur nicht Säuger, sowie auch erwachsene Pferde dienen. Wir wissen nicht, warum der Zusatz eines Stückchens Gehirngewebes zu unserem Nährboden für das Wachstum der Spirochäten eine so große Bedeutung hat, unwillkürlich aber entsteht die Frage, ob dieser Umstand nicht in Verbindung mit den Beobachtungen der Autoren (Buschke und Kroo, Tomioka) über die Neigung der Recurrensspirochäten, im Gehirngewebe sich zu lokalisieren und lange Zeit zu erhalten, steht.

Welche Bedeutung hat die Ueberschichtung des Nährbodens mit Paraffinöl?

Wir sind in diesem Falle nicht geneigt, dem Paraffinöl eine anaërobe Bedingungen schaffende Rolle zuzuschreiben. In Uebereinstimmung mit anderen Autoren (Gates, Olitzky, Kliegler und Robertson) und auch mit der Arbeit von Ploetz und Schoene (Annal. de l'Instit. Pasteur, T. 38. No. 10) betreffs der Reaktionsänderungen des Serums beim Aufbewahren, sind wir der Meinung, daß die Paraffinölschicht die Steigerung der Alkalität des Nährbodens verhindert, welche in scharfer Form in den Versuchen beim Aufbewahren des Serums im Brutschrank bei 37° C eintritt. Zu diesem Zwecke, d. h. um die Reaktionsänderung des Serums zu vermeiden, überschichten

wir auch das Serum mit Paraffinöl, welches zur Herstellung des Nährbodens an einer kühlen Stelle aufbewahrt wird.

Nachdem wir mit Hilfe des neuen Nährbodens solche befriedigenden Resultate erhalten hatten, haben wir einige Versuche an weißen Mäusen angestellt zur Prüfung der Virulenz unserer Kulturen. Alle angestellten Versuche, außer 1, bei dem für die Injektion eine spirochätenarme, 24stünd. Kultur genommen worden war, gaben positive Erfolge. Bei der Injektion von 0,3—0,5 ccm einer genügend entwickelten Kultur (am besten 2 oder 3 Tage alter) in die Bauchhöhle konnten wir nach 5—6 Std. das Erscheinen von Spirochäten im Blute des Tieres beobachten, wo sie sich $1^1/_2$—2 Tage hielten. Der größte Teil der Tiere ging am 3. Tage zugrunde. In Ermangelung von Rekurrenskranken in letzter Zeit in Kasan sind alle hier mitgeteilten Beobachtungen an dem Laboratoriumstamm der Spirochaete Obermeieri durchgeführt worden. Dieser Stamm wurde im März 1924 unmittelbar aus Krankenblute nach unserer ursprünglichen Methode ausgeschieden. Von dieser Zeit an wird er bei uns in vitro erhalten, und hat 75 Generationen auf unserem früheren Nährboden geliefert. Dann, nachdem er auf den neuen Nährboden mit Stückchen Gehirngewebes übergeführt war, gab er zu jetzt auf diesem Nährboden noch 60 nachfolgende Generationen. Auf diese Weise hat unser Stamm, nachdem er aus dem Menschenorganismus in Röhrchen gekommen war, im Laufe von 10 Monaten 135 Generationen durchgemacht hat, die für weiße Mäuse sich als pathogen erwiesen haben.

Ueber Anopheles-Zucht (mit einigen Anopheles-Beobachtungen).

[Aus dem Institut für Schiffs- und Tropenkrankheiten, Hamburg.]

Von **E. Martini.**

Mit 3 Abbildungen im Text.

Mac Gregor teilt in Nr. 4. 1924 des Bulletin of Entomological Research mit, daß ihm die Zucht der Anophelen durch mehrere Generationen auf Mauritius keine Schwierigkeiten gemacht habe. Es handelt sich um folgende Arten: A. mauritianus, maculipalpis, costalis, funestus. Er betont, daß die Zucht der Anophelen in England in dieser Weise bisher nicht geglückt sei und kommt zu dem Schlusse, daß es wohl eine Kleinigkeit in der Anordnung der Zuchtbedingungen sein müsse, die wir noch nicht kennten und die über den Erfolg unserer Bemühungen entscheide. Die Ursachen können wohl kaum darin zu suchen sein, daß die Männchen der europäischen Arten einen größeren Raum zum Tanzen und zur Ausführung der Begattung beanspruchen als die oben genannten.

Wie gewöhnlich in englischen Arbeiten, wird von der einschlägigen Literatur nicht viel erwähnt, und es möge daher gestattet sein, hier auf frühere Beobachtungen zu verweisen, welche ein gewisses Licht auf diese Angelegenheit zu werfen scheinen. Eysell teilte 1912 eine

Unterbringungsart von Stechmücken mit, in der auch der, wie er sagt, sonst schwer zur Eiablage zu bringende A. nigripes seine Eier unschwer ablegt. Die Anordnung bezweckt, daß sich die Mücke in einer mit Wasserdampf gesättigten Luft befindet. Ich selbst habe systematische Versuche erst in den letzten 3 Jahren begonnen, und das auch nur nebenher. Schon vorher war es mir aber einmal gelungen, von A. nigripes Ablage von Eiern im Laboratorium gezüchteter Stücke und aus ihnen wieder die Imagines zu erhalten (1921), ebenfalls in einer Versuchsanordnung, in der den Mücken Unterschlupf mit hoher Luftfeuchtigkeit zur Verfügung stand.

Meine Zuchtapparate bei den sonstigen Versuchen waren zunächst die folgenden: Glasaquarium mit Gazeausflug siehe Fig. 1 und großes Holzaquarium mit Ausflug, teils aus Glas, teils aus Gaze, siehe Abbildung 2 und Figurenerklärungen. Beide Modelle sind für die zeit-

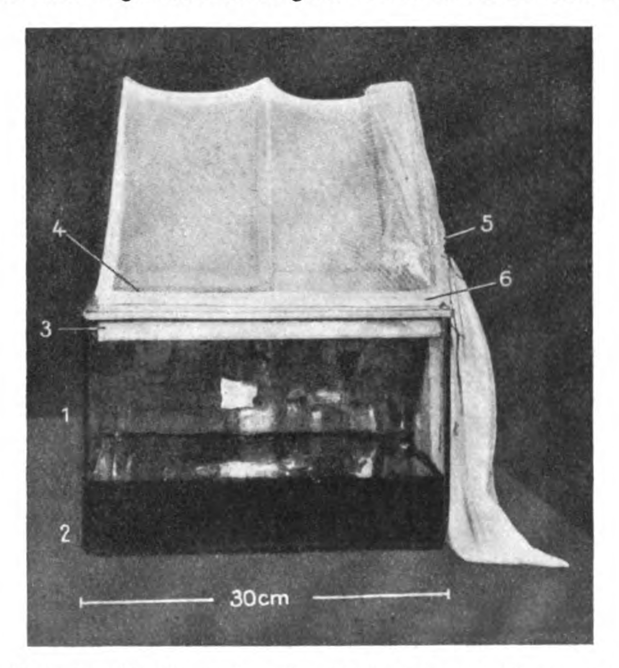


Fig. 1. Einfaches Zuchtaquarium für Stechmücken. *1* Glasaquarium, *2* Wasser in demselben, *3* der außen über den Glasrand greifende Zinkblechrahmen des Drahtgestelles, *4* auf den oberen Rahmen aufgelegtes Brett zum Tragen des Futternapfes oder der Blutspender. *5* Aermel zum Eingehen mit der Hand, der bei *5* mit einem Bindfaden abgebunden wird, *6* verstärkter Rand der Gaze, der durch Fäden an den durchlöcherten oberen Teil des Zinkrahmens befestigt ist.

weilige Haltung von Anophelen und für Aufzucht aus Eiern oder Larven recht brauchbar.

In den kleineren Gefäßen habe ich nie Eiablage von gezüchteten Weibchen erhalten, selbst dann nicht, wenn die dem Licht zugewandte Schmalseite mit einem rechtwinkelig geknickten Pappkarton verschattet war, und auf der Gaze Watte, mit Wasser oder Zuckerwasser getränkt, lag. Auch in den großen Zuchtkästen wurde niemals in Zeiten, wo genau beobachtet werden konnte, die zweite Generation erzogen; ob zu anderen Zeiten, wenn aus dem Freien wiederholt Larven und

Imagines zugeführt wurden, auch einmal ein gezüchtetes Weibchen abgelegt hat, kann ich nicht sagen.

Im Frühjahr, Juni, 1922 holte Herr Dr. Richters aus unserer Gegend Anophelen (A. maculipennis) nach Berlin, besah unsere Unterbringung der Stechmücken und richtete in Berlin aus einem chirurgischen Instrumentenschrank einen Zuchtraum her, in dem die Mücken bis in den Hochsommer sich hielten und vermehrten. Man muß also wohl annehmen, daß dort auch gezüchtete Weibchen Eier abgelegt hatten. Ich selbst baute danach meinen Zuchtapparat zu dem in Fig. 3 gegebenen Gebilde um. Doch waren vorerst die dreieckigen Fenster noch aus Gaze hergestellt. Der Flugraum für die Männchen war ungefähr ebenso hoch und weiter als der in Berlin, doch glückte die Zucht 1923 nicht, ebensowenig übrigens, soviel mir Herr Richters mitteilte, in demselben Jahre in Berlin. Die Luft in unserem Käfig war

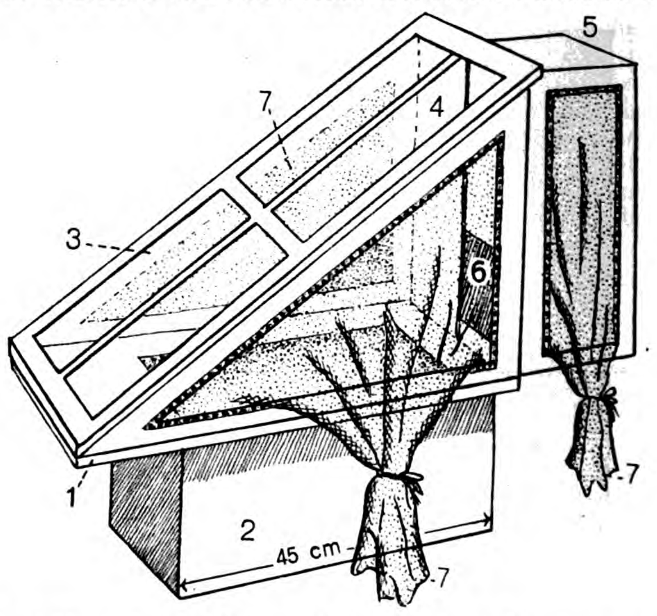


Fig. 2. Größerer Anopheleskasten. *1* Grundplatte, *2* darunter gesetzter Kasten mit Wasser und Wasserpflanzen für Eiablage und Larvenzucht, *3* das vordere schräge Glasfenster des Aufbaues, *4* Spiegel der Hinterwand, der die Beleuchtung der Wasservegetation verstärken soll, *5* der Hinterwand angefügte Schlafstube der Mücken, *6* Einflug in dieselbe, *7* die die schmale Seite des Ausfluges und eine Seite der Schlafstube verschließenden Gazeärmel. Die Hinterwand der Schlafstube ist aus Glas und kann mit schwarzem Tuch von außen verhängt werden. Die andere schmale Wand der Schlafstube ist hölzern.

im Sommer ziemlich trocken. Um die von den Wasserflächen abgegebene Feuchtigkeit besser zusammenzuhalten, wurden in den Dreiecken die Tüllwände durch Glas ersetzt. Später wurde noch ein Zinkeinsatz mit Erde auf den Boden gestellt, in den Gras gesät wurde und in den auch die Wassergefäße eingesetzt wurden. Um von dem Schlafraum die Hitze abzufangen, wurde derselbe mit Zierpflanzen gegen die unmittelbare Besonnung geschützt.

Inzwischen war von C. H. H. Harold mitgeteilt, daß er Zuchten erhalten habe, wenn er die Larven mit Vergißmeinnicht gefüttert hätte.

die er zerquetscht hatte. Zuchten solcher Art, die wir noch im Spätherbst 1923 mit bifurcatus-Larven versuchten, ergaben keinerlei Fortschritte. Harold meint, die Luftfeuchtigkeit seiner Käfige sei nicht von Bedeutung für den Erfolg gewesen. Ich lasse das dahingestellt.

In unseren neuen Behältern erzielten wir nach dem Auflaufen des Grases bald sehr hohe und an sonnigen Tagen schwankende Luftfeuchtigkeiten. Nachts wurden stets 90 Proz. oder mehr Sättigung erreicht, an warmen sonnigen Tagen jedoch ging der Feuchtigkeitsgehalt auf ungefähr 50 Proz. in der Mittagszeit zurück, die Mücken zogen sich dann in die Schlafstube oder ins Gras zurück. Es war

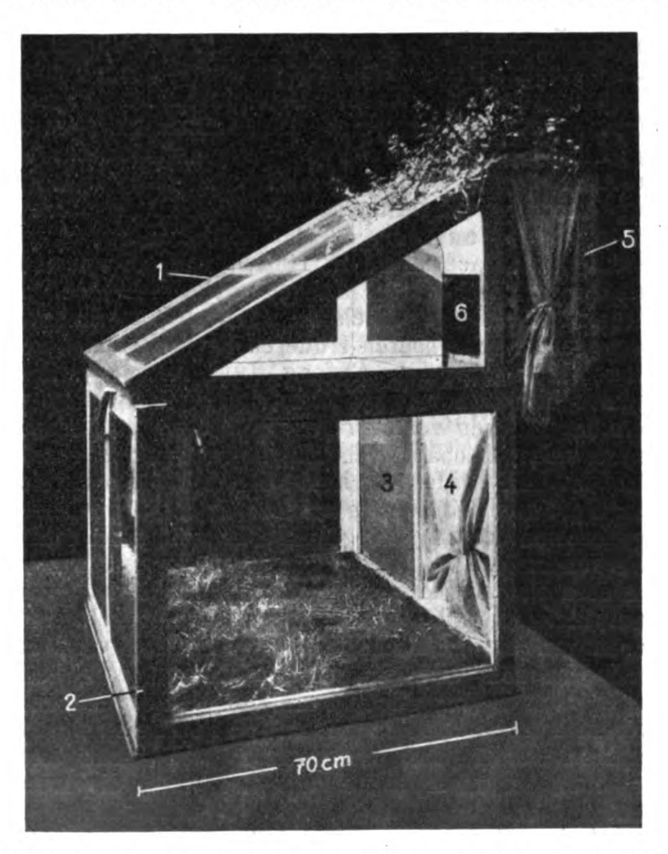


Fig. 3. Kasten für Dauerzucht von Anophelen. *1* oberer Teil wie der Aufsatz der vorigen Figur, aber die Seiten mit Glas abgedeckt und auf einem Zinkblech auf dem Dach der Schlafstube ein paar Töpfe mit Rankpflanzen, um die Schlafstube zu beschatten und im Sommer vor Ueberhitzung zu schützen. *2* unterer Teil mit Zinkeinsatz, in dem die Erde mit Gras angesamt ist und Schalen mit Wasser und Wasserpflanzen stehen. Dieser Teil ist vorn und an den Seiten verglast. Hinterwand bei 3 mit einem mit Drahtgaze bespannten Rahmen verschlossen. Bei *4* Aermel zum Eingehen mit Hand oder Kopf. Im Inneren des unteren Teils Nagel für Thermo- und Hydrometer. *5* u. *6* wie Fig. 2.

der Zwinger einmal im Frühjahr (März) besetzt mit durchwinternden Anophelen. Ihre Brut wurde mit Piscidin gefüttert, außerdem enthielten die Schalen Lemna und allmählich eine den Grund und die Seiten bedeckende Algen- usw. Vegetation. Die Fütterung der Erwachsenen

geschah wöchentlich einmal mit Blut. Sie erhielten wöchentlich einmal eine Ratte und ein Meerschweinchen, welche beide von den Anophelen gestochen wurden. Nachdem die Tiere nachts im Käfig der Mücken gewesen waren, waren die Anophelesweibchen auch ungefähr alle vollgesogen. Außer der Blutnahrung standen den Anophelen dauernd auch zwei Schälchen mit Watte zur Verfügung, welche mit Zuckerwasser getränkt war. Honigwasser oder Bananen oder andere Süßigkeiten wurden in der ganzen Beobachtungszeit nicht gegeben. Neue Anophelen wurden nach der ersten Bestockung von außen nicht zugeführt. Anfang September saß eine Schar von wohl sicher 10mal mehr Mücken, als eingeführt, im Käfig, obwohl wiederholt Larven und Mücken zu anderen Zwecken entnommen sind und gerade kürzlich etwa 400 Larven aus den Wassergefäßen wegen Uebervölkerung entfernt werden mußten.

Nach den ungünstigen Nachrichten aus Berlin 1923 hatte ich schon gedacht, ob nicht doch eine Täuschung vorliegen könne und wenige langlebige Weibchen der Frühjahrsgeneration für die gesamte Mückenproduktion verantwortlich sein könnten, ohne daß die im Laufe des Sommers erzeugten Imagines an der Vermehrung beteiligt seien. Das scheint mir aber aus folgenden Gründen ausgeschlossen. Nach allen vorliegenden Beobachtungen in Italien und bei uns muß man annehmen, daß die durchwinterten Mücken nicht mehr sehr lange leben, manche Autoren scheinen anzunehmen, daß die überhaupt nur einen Satz Eier erzeugen. Nach unseren früheren Beobachtungen verschwinden diese Mücken hier im Freien Anfang Juni in gewöhnlichen Jahren und dürften also dies Jahr etwa Mitte Juni verschwunden sein. Eine Langlebigkeit der Mücken vom vorigen Herbst bis in diesen September, der die letzten sicher beobachteten Eiablagen brachte, erscheint allem, was bekannt ist, zu widersprechen. Endlich beobachteten wir im Sommer eine Größenverminderung unserer Zuchtanophelen. Man hätte an eine Degeneration des Stammes denken können, denn zahlreich traten richtige Zwergexemplare auf. Ich war aber der Meinung, daß diese Zwergstücke eben Sommertiere seien, die, durch die hohe Wärme stark getrieben, nur klein ausfallen (siehe auch meine Arbeit von 1924). In der Tat waren von diesen kleinen Stücken Anfang Oktober nur noch ganz wenige vorhanden, und es überwiegen mittelgroße Stücke wieder bei weitem. Das ist nur möglich, wenn die kleinen Stücke bereits ihr Leben größtenteils abgeschlossen haben. Nach allem, was wir wissen, ist es unwahrscheinlich, daß unbegattete, sich nicht fortpflanzende Weibchen rascher absterben sollten als begattete, die wiederholt abgelegt hatten.

Es scheint mir daher bewiesen, daß es sich bei den jetzt auftretenden jungen Larven um die Nachkommenschaft mindestens der zweiten, vielleicht schon der dritten Zuchtgeneration handelt.

Damit ist, glaube ich, zunächst gezeigt, daß auch in unserer Gegend eine Weiterzucht der Anophelen möglich ist, und es scheint mir nicht unwahrscheinlich, daß die nötige Feuchtigkeit der Luft die grundlegende Bedingung ist, die auf Mauritius in seiner maritimen Lage vielleicht von selbst vorhanden ist, in unserem Klima und wohl noch mehr im mittelländischen aber künstlich mühsam hergestellt werden muß.

Ich habe schon früher darauf hingewiesen, daß mir die relative Luftfeuchtigkeit (wie übrigens auch Sella) als einer der wichtigsten Faktoren im Leben der Insekten erscheint (1922), daß die Ursache, warum die einen Mücken tags, die anderen nachts munter sind, viel-

leicht weniger in den Licht- als in den Luftfeuchtigkeitsverhältnissen zu suchen ist, daß letztere für die Malariafähigkeit der Wohnungen eine ausschlaggebende Rolle spielen.

Ich habe mir über den Einfluß der Luftfeuchtigkeit auf Begattung und Eiablage der Anophelen folgende Theorie zurecht gelegt. Wenn wir bei hohem Barometerstande trockene Luft haben, so würden die Larven aus um diese Zeit abgelegten Anopheleneiern in Gefahr sein, aufs Trockene zu gelangen und zu verkommen. Daher besteht vielleicht ein Vorteil für die Art, wenn unter solchen Umständen die Eiablagen nicht zustande kommen, vielmehr die beflügelten Mücken sich in nicht zu trockene Schlupfwinkel flüchten und dort ruhig verhalten, und wenn die die Eiablage vorbereitenden Akte, wie Begattung und Blutsaugen, gehemmt sind. Zwar konnte ich zeigen (1923), daß Anopheles bifurcatus Eier auf feuchter Unterlage sich bis 6 Wochen (vielleicht länger) halten, und diese Zeit dürfte zum Ueberdauern der sommerlichen Trockenperioden im Nordseeklima fast immer voll ausreichen, selbst wenn A. maculipennis wesentlich empfindlicher sein sollte und seine Eier nur etwa die Hälfte der Zeit außer Wasser aushalten. Aber die Arten sind ja weiter verbreitet und die Anophelen überhaupt eine Gattung, die ihren Schwerpunkt in den Subtropen und Tropen hat. Zum Beispiel im Klima von Italien und dem Balkan dürften Gelege aus dem Beginn trockener Zeiten in der Regel verloren sein. Dagegen sind bei Steigerung der Luftfeuchtigkeit und fallendem Barometer Niederschläge zu erwarten, und daher haben die Gelege aus solcher Zeit große Anwartschaft auf steigende Wässer, d. h. gute Entwicklungsbedingungen. Gehen doch hohe Luftfeuchtigkeit und niedriger und fallender Barometerstand so häufig Niederschlägen vorher, daß die Meteorologen geradezu aus solchen Verhältnissen Regen für die nächste Zeit voraussagen. Daher würde die Art also einen Vorteil haben, wenn feuchte Luft und sinkender Luftdruck sie zu Begattung und Blutsaugen anregen würde, wie das ja auch offenbar bei anderen Stechmückenarten der Fall ist. Immerhin sind die Lebensverhältnisse der Stechmücken so verschieden, daß hier doch wohl eines nicht für alle gilt. So läßt z. B. bekanntlich Steg. fasciata ohne Schwierigkeit sich auch in ziemlich trockener Luft dauernd fortzüchten und ist nach meinen Erfahrungen bei jedem Barometerstand und jeder Luftfeuchtigkeit stechbereit.

Mag diese Theorie nun gut oder schlecht sein, sie weist doch darauf hin, daß außer der Luftfeuchtigkeit (und der Wärme, deren Bedeutung ja schon allgemein anerkannt ist) auch noch andere Faktoren wichtig sein werden, und die merkwürdige Tatsache, daß in Berlin die Anopheles-Zucht in dem einen Jahr ging und im nächsten nicht, läßt mich nur mit allem Vorbehalt die Meinung aussprechen, daß doch wohl der von Mc Gregor gesuchte kleine, aber ausschlaggebende Faktor bei der Anophelenzucht der Feuchtigkeitsgehalt der Luft ist. Diese Auffassung scheinen mir wenigstens unsere Zuchterfolge erheblich zu stützen.

Bei dem allgemeinen Interesse, was für alle mit Malaria arbeitenden Laboratorien, besonders in den großen Städten, die Möglichkeit bietet, Anophelen dauernd weiter zu züchten und wenigstens im Sommer jederzeit in größerer Zahl vorrätig zu haben, teile ich meine Erfahrungen schon jetzt mit, weil die noch bleibende Frage, ob bei dem Erfolg lokale Verhältnisse oder besondere klimatische Verhältnisse des

Jahres 1924 mitbeteiligt sind oder wirklich durch Erhaltung hoher Luftfeuchtigkeit das Zuchtproblem gelöst ist, um so schneller geklärt wird, je mehr Stellen nach dem oben erläuterten Grundplan die Anopheleszucht aufnehmen.

Natürlich ist mit der Zucht der Anophelen über Sommer noch nicht die Zucht über Winter gelöst. Hier liegt vielleicht für maculipennis, wie besonders Grassi wieder betont hat, eine physiologische Ruheperiode vor[1]). Ihre Ursachen brauchen keineswegs die gleichen zu sein, wie die Hemmungen der Entwicklung unter ungeeigneten Zuchtbedingungen im Sommer, und es wäre durchaus möglich, daß sich bei der Weiterzucht der Anophelen die Notwendigkeit ergeben würde, den Bestand vom Spätherbst ab einer mehr oder weniger ausgiebigen Winterruhe auszusetzen. Auf die Frage der Ruheperioden, die ja schon Roubaud eingehend erörtert hat, komme ich wohl demnächst an anderen Orten zu sprechen.

Unsere Anophelenzucht, obgleich nicht besonders in dieser Richtung ausgenutzt, lehrt doch schon einiges zur Lebensweise der Anophelen. Wenn auch von einer Seite vor kurzem behauptet wurde, ein Ausflug ins Freie sei für die Gesundheit der Anophelen notwendig, so zeigt unsere Zucht, daß dieselben, sofern überhaupt erhebliche Flugleistungen für ihr Wohlergehen erforderlich sein sollten, diese in einem sehr beschränkten Raum durchführen können, daß sie sich auch ohne Möglichkeit weiterer Ausflüge durch mehrere Generationen vollkräftig erhalten lassen.

Die Bestätigung der Angaben Roubauds über den täglichen Wechsel der Aktivitäts- und Ruhezeit, von dem der Autor sagt, daß er bei gleicher Wetterlage, also Belichtungsverhältnissen mit astronomischer Pünktlichkeit ablief, konnte natürlich nicht beigebracht werden, weil in unserer Gegend beständige Witterung zu den seltenen Vorkommnissen gehört. Dagegen fiel auf, daß die vollgesogenen Mücken sich in der Regel im Dunklen, in ihrer Schlafstube aufhielten oder oberhalb derselben unter den Ranken der Tradescantie saßen, meist aber, wie gesagt, im Schlafzimmer, nur wenige im Gras. Näherte man sich dem Käfig, so blieb alles ruhig. Dies Verhalten zeigte sich am Tage nach der Fütterungsnacht und genau so deutlich noch am nächstfolgenden Tage, von da ab ging allmählich das Verhalten in das entgegengesetzte über, wie man es in den Tagen kurz vor der neuen Fütterung beobachtete, dann war die Schlafstube von Weibchen manchmal ziemlich leer, einige Männchen saßen darin, die Mehrzahl der Weibchen saß draußen im Gras und wurde, wenn man sich dem Kasten näherte, sehr aufgeregt, um sich allerdings nach kurzer Zeit wieder zu beruhigen. Das würde darauf schließen lassen, daß die satten Weibchen einen starken negativen Phototropismus haben, der sie in zuverlässige Schlupfwinkkel nötigt, daß dagegen die hungrigen Weibchen einen solchen wenig erkennen lassen, eher umgekehrt, also in Gegenden bleiben, wo sie unter natürlichen Verhältnissen Wild und anderes kleineres Getier treffen könnten, und daß sie auf Erscheinen solcher Beute auch sehr leicht ansprechen. Daß die Anophelen in der Gefangenschaft Rattenblut so gerne nehmen, gibt Anlaß zur Frage, ob ihnen nicht auch im Freien die kleineren Nagetiere in erheblichem Maße durchhelfen können. Das würde allerdings zu der Auffassung

---

1) Vergl. jedoch den vorletzten Absatz dieser Mitteilung.

führen, daß die Lehre irrig ist, wonach A. maculipennis fast ausschließlich in geschlossenem Raum sticht. Er sticht auch da und bleibt wenn er satt ist, dort, und wenn er wieder hungrig ist und hat gleich in der Nähe wieder Beute, so fliegt er vielleicht nicht aus. Immerhin ist der bevorzugte Ruheplatz offenbar eine Funktion mehrerer Variabler, und die einzelnen Faktoren wirken vielleicht keineswegs nach ganz strengen Regeln, wie daraus hervorzugehen scheint, daß auch vollgesogene Anophelen sich gelegentlich im Grase finden.

In der letzten Septemberzeit, wenn die Temperatur zwischen 14 und 20° schwankte, war die Verdauung in 6 Tagen noch nicht erledigt.

Weiter ist es für unsere Gegend wohl fraglich, ob nach jeder Blutmahlzeit eine Eiablage erfolgt. Da man durchaus den Eindruck hatte, daß die Weibchen jede Woche ungefähr quantitativ stachen, hätte dann in der warmen Jahreszeit jede Woche von jedem ein Eiersatz da sein müssen, also im ganzen ein paar Tausend Eier. Davon aber war sicher keine Rede. Es scheint also nicht unmöglich, daß die Anophelen mehrfach stechen, ehe sie eine Portion Eier zur Reife bringen, wenigstens unter unseren klimatischen Verhältnissen und bei einer im ganzen etwas sparsamen Blutkost. Wenn sie Gelegenheit gehabt hätten, würden sie wohl in der warmen Jahreszeit mindestens doppelt so oft gestochen haben.

Ferner ist die sommerliche Größenabnahme der Zuchtexemplare zu beachten. Sie beweist am besten, daß die Wärme von maßgebendem Einfluß auf die Körpergröße der Anophelen ist, wie ich das bei der Kritik der Maxillarzahnzahlen und ihrer Beziehungen zur sog. Zoophilie der Anophelen bereits an im Freien gefangenem Material erläutert habe. Letzterem gegenüber könnte man allerdings einwenden, daß es eben doch zwei Rassen seien, von denen vielleicht die eine im Hochsommer häufiger gefangen sei als die andere. Läßt schon das Auftreten ganz paralleler Erscheinungen bei anderen Anophelen es wahrscheinlich erscheinen, daß doch die Maxillarzahnzahl einfach eine Funktion des Klimas ist, so zeigt sich hier in unserer Zucht, also an den gleichen Stämmen, die Abhängigkeit der Körpergröße von der Temperatur ganz deutlich. Die kleinere Gestalt der Anophelen hat also nichts mit ihrer Bosheit den Menschen gegenüber zu tun, sondern ist Funktion der Wärme.

Späte Larven des I. Stadiums wurden noch in den letzten Oktobertagen, und in einer anderen Schale solche des II. Stadiums am 20. 11. bemerkt. Doch waren ihrer in beiden Fällen nur wenige, Ende Oktober etwa 10. Letztere entstammten wahrscheinlich Eiern, welche an den Rand der Schale oberhalb des Wassers geraten waren, wo ich sie Mitte September bemerkt hatte. Erst in den letzten Oktobertagen ist das Schälchen so stark mit Wasser gefüllt worden, daß diese Eier unter Wasser kamen. Die letzten Larven I. Stadiums vorher waren in den letzten Septembertagen vorhanden, der Zahl nach einem vollen Gehege entsprechend. Auch die jungen, am 20. 11. zuerst gesehenen Larven, von denen einzelne noch am 18. 12. nicht verpuppt waren, kann man wohl auf solche in der Entwicklung verzögerte Eier zurückführen. Es könnte also wahrscheinlich erscheinen, daß auch im erwärmten Raum nach September keine Eier mehr abgelegt werden. Anfang Oktober machte sich ferner eine deutliche Abnahme der Stechlust bemerkbar, obgleich künstlich die Wärme und auch die Feuchtigkeit ziemlich hoch gehalten wurde. Es sogen zeitweilig ungefähr 10 Proz., später oft auch 20 oder 30 Proz. der Weibchen.

Es scheint danach, daß im künstlichen warmen Klima die physiologische Umstimmung ungefähr in die gleiche Zeit wie im Freien fällt. Auch im Freien dürften bei uns nach Mitte September wenige Eier mehr abgelegt werden. Gelegentlich mögen bei Herbstregen auch in unseren Wiesengräben bisher zu hoch gelegene Eier schlüpfen und für einige Nachzügler von Larven oder Männchen verantwortlich sein. Jedenfalls stimmt die Beobachtung einer erheblichen Unabhängigkeit von der Wärme gut mit Grassis Feststellung überein, daß in Italien die A. maculipennis ungefähr gleichzeitig in die Winterstimmung übergehen, wie in Bayern. Falleroni fand im Freien das letzte Männchen am 25. 11. in den pontinischen Sümpfen. Danach dürften dort ebenfalls draußen Gelege kaum nach September vorkommen.

Leider aber stimmt meine Beobachtung in einem anderen Zuchtkasten, in den immer aufs neue frisch gefangene Anophelen eingebracht wurden, nicht zur Annahme einer von der Wärme unabhängigen Winterstimmung. Denn hier fanden sich bis zum 4. 1. 1925 alle Larvenstadien von A. maculipennis (neben einigen Larven von A. bifurcatus), so daß es hier also fortgesetzt einzelne Gelege gegeben haben muß. Es kommt also eine winterliche Umstimmung mit völliger Stillegung der Fortpflanzung in Norddeutschland nicht unter allen Umständen zustande, genau wie in den pontinischen Sümpfen Falleroni im Thermostaten in allen Wintermonaten ein dem sommerlichen ähnliches Verhalten beobachtete, allerdings nicht im Laboratorium. Auch Grassi sah im Winter die Anophelen im Laboratorium zugrunde gehen ohne Eiablage.

Bedürfen alle diese Beobachtungen dringend der Aufklärung durch weitere Versuche, so glaube ich, daß unser Zuchtverfahren einen Schritt weiter zu dem Ziel bedeutet, den Anophelen im Laboratorium ausreichend natürliche Bedingungen zu schaffen, um die wichtigsten Fragen ihrer Bionomie experimentell in Angriff nehmen zu können.

Zur Frage der sogenannten phytotoxischen Wirkung des Blutserums.

[Aus dem Hygienischen Institut der Universität Leipzig (Direktor: Geh.-Rat W. Kruse).]

Von Prof. **K. Hintze.**

Der Volksglaube, daß Frauen während der Menstruation eine Art Gift ausscheiden, das auf belebte Organismen, besonders solche pflanzlicher Natur, und sogar auf leblose Gegenstände eine schädigende Wirkung auszuüben vermag, ist offenbar sehr alt. Er läßt sich vom Altertum durch das Mittelalter bis in die neuere Zeit verfolgen und ist auch heute noch nicht erloschen. Sein Bereich ist nicht nur auf Europa und die alten Kulturkreise um das Mittelmeer beschränkt, sondern scheint sich auf die verschiedensten Nationen, Rassen und Stämme sehr verschiedener Kulturhöhe zu erstrecken. Auch inhaltlich finden wir im wesentlichen dieselben Anschauungen wiederkehren.

Plinius berichtet schon, daß der Most durch ihre Berührung umschlage, die Feldfrüchte werden unfruchtbar, Pfropfreiser sterben

ab, die Keime in den Gärten verdorren, selbst die Früchte der Bäume, unter denen sie gesessen haben, fallen ab usw. Ihr Blick genügt sogar, um den Glanz des Spiegels matt zu machen, und die Schneide scharfen Eisens wird stumpf, wenn sie sie anfassen. Aehnliche Anschauungen sind auch heute noch, wie gesagt, nicht ganz ausgestorben und in verschiedenen Gegenden vorhanden. Die Frau soll während der Zeit keine Butter stoßen, darf nicht backen, Wein, Essig, Bier, das sie abzieht, verdirbt; betritt sie eine Brauerei, schlägt das Gebräu um, Eingemachtes hält sich nicht, Blumen gedeihen nicht, sondern welken schnell u. a. m. In Südfrankreich soll es während der Menses Frauen nicht gestattet sein, in den Parfumeriefabriken zu arbeiten, Seidenwürmer zu versorgen oder feine Pilze zu sortieren (1).

Auf dieses sog. Menotoxin wurde vor einigen Jahren durch B. Schick (2) von neuem die Aufmerksamkeit gelenkt anläßlich einer konkreten Beobachtung, daß Blumen verschiedener Art, die einige Zeit von einer menstruierenden Frau in der Hand gehalten wurden, schnell welkten und auch nach Aufhören der Berührung sich nicht wieder erholten.

Amerikanische und deutsche Autoren haben sich dann weiter mit der Frage beschäftigt.

David; J. Macht u. Dorothy; S. Lubin (1) stellten zahlreiche Versuche an, über die sie in einer ausführlichen und mit zahlreichen Abbildungen versehenen Arbeit berichten. Sie ließen Blutserum, rote Blutkörperchen, Speichel, Schweiß und Milch menstruierender Frauen auf die etwa 3 Tage alten ausgekeimten Wurzeln von Lupinus alb. einwirken und verglichen damit die Wirkung, welche dieselbe Substanzen während der Menopause ausübten. Lup. alb. treibt nur eine gerade Wurzel, welche sich recht genau messen läßt. Zu einer Nährlösung — sie benutzten die sog. Shive solution — wurde 1 Proz. der zu untersuchenden Substanz hinzugesetzt, die Lösung in Röhrchen gefüllt und die Lupine daraufgesetzt, so daß die etwa 2—3 cm lange Wurzel eintauchte. Die Röhrchen wurden bei ca. 20—25° C im Dunkeln gehalten. Eine Reihe mit Nährlösung ohne Zusatz diente als Kontrolle. Nach 24 Std. wurde die Länge der Wurzeln gemessen und daraus das Prozentverhältnis des Wachstums im Vergleich mit den Kontrollen berechnet.

Auf Grund ihrer Befunde kommen sie zu dem Schluß, daß die untersuchten Substanzen in der Tat einen Giftstoff enthalten (contain a toxic substance characterized by specific pharmalogical and chemical reactions). Dieses Menotoxin hat einen stärkeren Einfluß auf Pflanzenprotoplasma als auf tierisches Gewebe; es findet sich in verschiedener Menge bei den verschiedenen Individuen und ist am reichlichsten unmittelbar vor oder während der ersten Tage der Menstruation vorhanden. Gegen Wärme ist es ziemlich widerstandsfähig, läßt sich nicht dialysieren, aber durch Alkohol, Aether, Chloroform und Aceton in mehr oder weniger hohem Grade ausziehen. Es scheint physiologisch in Beziehung zu stehen zu der Tätigkeit des Ovariums und des Corpus luteum und Eigenschaften zu besitzen, welche es chemisch dem Oxycholestearin verwandt erscheinen lassen.

Von deutschen Autoren sind es besonders O. Polano und K. Dietl (3), welche „Die Einwirkung der Hautabsonderung bei der Menstruation auf die Hefegärung" untersucht haben. Auf die Art der Versuchsanordnung kann hier nicht näher eingegangen werden; sie muß im Original eingesehen werden, das ja überall leicht zugänglich ist.

Es sei nur bemerkt, daß die Hefe ca. 10 Min. zwischen den Fingern geknetet und dann in die Gärröhrchen gegeben wurde. In der Arbeit ist auch auf einige Versuche anderer Autoren Bezug genommen. Die Unstimmigkeit derselben veranlaßten die Verff. mit zu eigenen Untersuchungen. Sie kommen zu dem Ergebnis, daß „die während der Periode vorhandene stärkere Absonderung von Stoffen, die normalerweise im Hautsekret vorhanden sind, alleine genügt, um den Einfluß der Menstruierenden auf die Hefe zu erklären, und daß keine Veranlassung vorliegt, hierbei zu einem unbekannten Menotoxin seine Zuflucht zu nehmen". Das Serum der Menstruierenden sowie das Menstruationsblut hatte auf die Gärkraft der Hefe einen gleichsinnigen Einfluß. Vielleicht spielen Cholin, Kreatin und Kreatinin oder eine Kombination aller in verschiedenem Verhältnis dabei eine Rolle.

Anderseits berichten E. Herz und R. Weichbrodt (4), die sich derselben Versuchsanordnung wie die Amerikaner bedienten: „Auch wir konnten feststellen, daß Serum, einen Tag vor oder im Beginn der Menstruation entnommen, das Wachstum der Lupinenkeimlinge sichtbar hemmt." Auch bei gewissen Frauen von Geisteskranken (psychomotorische Erregung Katatoner) sahen sie immer hohe Toxizitätswerte, während sie bei anderen (Stuporösen) fehlten.

Gewisse andere Untersuchungen veranlaßten mich, einige Versuche darüber anzustellen, ob und in welchem Umfange Seren verschiedener Herkunft einen Einfluß auf das Wachstum von Pflanzenwurzeln ausüben. Da Lupinus alb. nicht in genügender Menge zur Verfügung stand, benutzte ich eine früh keimende gelbe Erbse, die aus einer hiesigen Samenhandlung bezogen wurde und sich ebenfalls gut für derartige Versuche eignete. Man läßt die Erbse etwa 24 Std. in Leitungswasser quellen und pflanzt sie dann in fein gemahlenen und gesiebten Torf ein. Bohrt man mit einem Holzstäbchen einen Kanal in den Torf, pflanzt die Erbsen in der richtigen Weise ein und hält das Saatbeet hinreichend feucht bei 20—25° C, so entwickeln sich die kleinen Wurzeln sehr schnell und schön gerade. Nach 2 Tagen sind sie im allgemeinen 2—3 cm lang. Man sucht sich die besten heraus, kann ihre Länge sehr genau bestimmen und sie zu dem Versuch benutzen.

Mindestens 5 Röhrchen dienten als Kontrolle (mehr zu nehmen hat, wie die Erfahrung lehrte, wenig Zweck, da die Resultate dadurch kaum beeinflußt werden). Sie wurden mit zur Hälfte mit aqua dest. verdünnter Shive sol. gefüllt und die Erbsen darauf gesetzt. In die anderen Röhrchen kam dieselbe Nährlösung, nur mit einem Zusatz von Serum usw. in den verschiedenen Konzentrationen. Da die kleinen Pflanzen außerordentlich viel Wasser verbrauchen, muß man nur darauf achten, daß die Röhrchen stets so viel Flüssigkeit enthalten, daß die Wurzelspitze eintaucht. Nach 24 Std. Aufenthalt bei Zimmertemperatur im Dunkeln wurden die Längen der Wurzeln gemessen. Der Durchschnitt der Kontrollen wurde gleich 100 gesetzt und danach der Prozentsatz des Wachstums der Wurzeln mit den verschiedenen Zusätzen berechnet. Die Zahlen geben also den Prozentgehalt des Wachstums wieder im Vergleich mit den Kontrollen. Statt der Nährlösung kann man übrigens, wie sich herausstellte, gewöhnliches Leitungswasser nehmen, ohne daß dadurch eine wesentliche Veränderung in den Wachstumsverhältnissen hervorgerufen würde.

Die Ergebnisse der Versuche sind auf der untenstehenden Tabelle zusammengestellt.

Lfde. Nr.	Vers. Nr.	Serumzusatz 0,1 %	1 %	5 %
A. Wassermann-Seren positiv				
1	7	—	—	72
2	9	—	—	41
3	8	—	—	53
4	10	—	67	17
5	15	—	81	23
6	16	—	53	—
7	21	—	54	24
8	26	—	23	17
9	28	—	51	29
10	44	—	50	69
11	44	—	44	51
12	46	—	102	75
13	47	—	37	25
14	60	—	74	43
15	61	300	104	—
B. Wassermann-Seren negativ				
1	7	—	—	57
2	9	—	—	34
3	8	—	—	50
4	13	—	—	28
5	17	—	125	88
6	27	—	131	76
7	29	—	48	24
8	32	—	89	81
9	33	—	90	53
10	34	—	112	59
11	38	—	75	41
12	43	—	38	61
13	49	—	65	30
14	50	—	112	65
15	51	—	155	173
16	52	—	97	40
17	59	137	54	70
18	66	93	32	—
19	66 a	97	33	—
20	67	109	86	—
21	67 a	113	27	—

Lfde. Nr.	Vers. Nr.	Serumzusatz 0,1 %	1 %	5 %	
C. Seren verschiedener Herkunft					
1	19	—	32	31	Lungenabszeß, Fieber
2	24	—	87	68	Peritonealtuberkulose?, Kachexie
3	30	—	52	51	puerperale Sepsis, T. 39,8
4	30a	—	78	59*)	„ „
5	31	—	47	75	chron. Nephritis, Phlegmone
6	31a	—	35	117*)	„ „ „
7	35	—	69	47	Paralyse m. Malaria behandelt
8	36	—	41	48	Paralyse
9	37	—	35	36	„
10	38	—	40	37	Ca. uteri
11	40	—	45	60	Pyelitis
12	45	—	49	35	Pneumonie
13	57	—	131	36	Dysenterie
14	58	—	100	76	Pleuritis, Abort
{15	62	56	63	—	Peritonsillarabszeß
16	62a	68	34	—	„
17	62b	105	89	—	„
18	62	380	220	—*)	„
19	62α	52	34	—*)	„
20}	62β	195	110	*)	„
21	63	58	30	21	Herzleiden n. Diphtherie
22	63a	84	72	52	„ „ „
23	64	112	43	—	Pneumonie
24	64a	96	31	—	„
25	69	106	99	—	Paralyse
26	70	85	80	—	„
27	71	123	59	—	„
28	72	107	53	—	„ m. Malaria behandelt
{29	73	83	68	—	Pyelitis
30	73a	97	76	—	„
31}	73b	72	57	—*)	„
D. Tierseren					
1	11	—	54	45	Hammelserum, frisch
2	20	—	80	73	„ „
3	25	—	77	56	„ „
4	22	—	340	57	Kaninchenserum, Lgg. Tbc.
5	22a	—	92	60	„ „ „
6	23	—	66	56	Kaninchen, Tbc.?
7	65	335	146	—	Kaninchen, Vereiterung a. Rücken
8	65a	88	97	—	„ „ „ „

Lfd. Nr.	Vers. Nr.	Zusatz 0,1 %	1 %	5 %
E. Diphtherietoxin 0,01 † 3.				
1	74	52	20	—*)
2	76	72	43	—*)
F. Tetanustoxin				
1	78	90	89	—*)
2	78a	64	69	—*)

Lfd. Nr.	Vers. Nr.	Zusatz 0,1 %	1 %	5 %
G. Bouillon				
1	79	97	83	—*)
2	79a	—	91	—*)
3	54	—	42	32*)
4	56	86	64	—*)
5	75	74	73	—
6	77	59	66	—
H. NaCl				
1	41a	—	45	2
2	48	—	37	0,0*)
3	41	147[1]	123[2]	—*)

*) Verdünnungsflüssigkeit, Wasser statt Shive solut.
1) 0,42; 2) 0,85 %.

Lfd. Nr.	Vers. Nr.	Zusatz		
		0,01%	0,1%	0,5%
I. Acid. bor.				
1	53	—	200	110
2	55	—	25	36
3	68	110	25	—*)

Lfd. Nr.	Vers. Nr.	Zusatz			
		1 : 1000	1 : 10 000	1 : 100 000	1 : 1 000 000
K. Sublimat.					
1	80	2	6	67	48*)
2	80a	4	8	74	97*)

Aus den Beobachtungen geht hervor, daß eine Beeinflussung des Wachstums der kleinen Wurzeln durch den Serumzusatz stattfindet. Je stärker der Zusatz, um so mehr wird auch im allgemeinen das Wachstum beeinträchtigt; daneben zeigt sich vielfach eine eigentümliche keulenförmige Auftreibung der Wurzeln, auf die auch die amerikanischen Autoren schon hingewiesen haben, die aber für die weitere Entwicklung der Pflanze ohne Bedeutung zu sein scheint. Nur in vereinzelten Fällen scheint ein gewisser stimulierender Einfluß vorhanden zu sein, ohne daß ein ersichtlicher Grund dafür vorläge. Wiederholt man das Experiment, so erhält man oft ganz abweichende Resultate (vgl. C. 15—17 und 18—20).

Das Wesentlichste aber ist, daß die Hemmungen bei Zusatz von Serum der verschiedensten Herkunft auftreten, ob es sich dabei um Blut von Gesunden, oder an den verschiedensten Krankheiten leidenden Personen handelt. Die Prozentverhältnisse schwanken in sehr weiten Grenzen, und bei einem nochmaligen Ansetzen des Versuches mit demselben Serum kommt meist etwas ganz anderes heraus. Auch bei den Amerikanern finden sich in ihren Tabellen derartige Schwankungen bei menstruierenden Frauen (von 35—66 Proz.), wenn auch nicht in dem Ausmaße. Sie suchen das dadurch auszugleichen, daß sie wieder den Prozentdurchschnitt von 50 Untersuchungen berechnen und nun finden, daß bei Nichtmenstruierenden das Wachstum 74 Proz., während der menses dagegen nur 51 Proz. der Kontrollen erreichte, woraus dann beim Serum und den übrigen Sekreten gefolgert wird, daß ein Toxin darin enthalten sein müsse.

Ueber Versuche mit Serum, Speichel oder Schweiß von Personen mit anderen Leiden wird nichts berichtet.

Die Fehlerquellen bei derartigen Versuchen sind doch zu groß, als daß man aus den Ergebnissen weitgehende Schlüsse ziehen könnte. Das Wachstum der kleinen Wurzeln hängt offenbar von sehr verschiedenen Umständen ab und kann, besonders unter den ganz unnatürlichen Verhältnissen eines derartigen Laboratoriumsversuches, durch Faktoren beeinflußt werden, die wir weder kennen noch beherrschen. Zum mindesten müßte man mit sog. reinen Linien arbeiten, um ein der inneren Beschaffenheit nach möglichst gleichmäßiges Material vor sich zu haben, auf welches man die zu untersuchende Substanz einwirken läßt. Die gewöhnlichen Samenpflanzen sind eine Mischung meist sehr verschiedener Herkunft, und es ist daher nicht gerade verwunderlich, daß, auch wenn man sie unter annähernd gleiche Bedingungen im Laboratorium bringt, doch das Wachstum ein verschiedenes sein wird. Woraus man wieder nichts folgern kann.

Die das Wachstum beeinträchtigenden Substanzen werden wohl als Salze anzusprechen sein. Stärker abgebaute lösliche Eiweißbausteine sollen ja allerdings auch von den Wurzeln der Pflanzen teilweise aufgenommen werden können, dürften aber wohl den Salzen gegenüber zurücktreten. Da die Salze in den Schweiß und Speichel übergehen,

ist eine gleichsinnige Wirkung dieser Sekrete nicht verwunderlich. Es wäre auch durchaus möglich, daß sie bei dem offenbar veränderten Stoffwechsel der Menstruierenden in verstärktem Maße in die Haut gelangten, worauf die eigentümlichen Ausdünstungen vieler Frauen während dieser Zeit hindeuten.

Ueber die Natur derselben läßt sich z. B. wohl noch nichts Bestimmtes aussagen.

Dagegen darf man wohl behaupten, daß durch derartige Versuche der Beweis für das Vorhandensein eines richtigen „Menotoxins" noch nicht erbracht ist.

Literatur.

1) Ploß-Bartels, Das Weib. 4. Aufl. Bd. 1. 1895. S. 223. — Jäger, G., Die Entdeckung der Seele. 2. Aufl. 1880. S. 189. — Macht, David J., and Lubin, Dorothy S., A phytopharmalogical study of menotoxin. (Journ. of Pharmacol. and Exper. Ther. Vol. 21. 1923. p. 413.) — 2) Das Menstruationsgift. Wien. klin. Woch. 1920. Nr. 191. — 3) Münch. med. Woch. 1924. Nr. 40. — 4) Dtsch. med. Woch. 1924. Nr. 36.

Weitere Studien über die Aktivierung von pathogenen Mikroorganismen durch abiurete Körperextrakte.

Von Professor Dr. **Wolfgang Weichardt** und Dr. **Leo Riedmüller**, Erlangen.

Seit dem Jahre 1920 haben Weichardt und seine Mitarbeiter Studien über die Aktivierung von pathogenen Mikroorganismen durch abiurete Körperextrakte angestellt. In Bd. 104 der Zeitschr. f. Hyg. S. 145, ist zusammenfassend darüber berichtet. Dort finden sich auch Angaben über die Darstellung dieser alkohol-wasserlöslichen abiureten N-haltigen Extrakte. Daß es Produkte sind, welche zu den Vorgängen im Körper Beziehung haben, geht aus dem bemerkenswerten Parallelismus zwischen ihrem Entstehen und bekannten physiologischen und pathologischen Zustandsänderungen hervor (Autolysen, Säuerungen, Mischinfektionen). Es wurde der Schluß gezogen, daß diese wirksamen Gruppen im Körper verhältnismäßig locker gebunden und durch die verschiedensten Einflüsse leicht abspaltbar sind. Die Möglichkeit eines ähnlichen Verhaltens, wie es Landsteiner für die Haptene annimmt, wurde erörtert. Unsere N-haltigen Extrakte haben den Vorteil einer guten Dosierbarkeit und gleichmäßigen Herstellungsmöglichkeit. Ferner wurde erwähnt, daß es möglich ist, die chemischen Wirkungen derartiger Extrakte von physikalischen zu trennen. Die Beeinflussung bestimmter Diphtheriebazillenstämme durch diese stickstoffhaltigen abiureten Körperextrakte hatte sich zu diesen Studien als sehr vorteilhaft erwiesen. Auch waren geeignete Stämme von Streptokokken herangezogen worden.

Diese Studien fallen in den Problemkreis, der neuerdings nach den klinischen Erfolgen mit Proteinkörpereinspritzungen sehr aktuell geworden ist. Weichardt vertritt den Standpunkt, daß es prinzipiell gleichgültig ist, welches System als Maßmethode für die Wirkung von Eiweißspaltprodukten herangezogen wird. Die gleichen Gesetze lassen sich allenthalben verfolgen, an der Körperzelle ebenso wie an den

Fermentäußerungen der Kleinlebewesen. Es ist deshalb bei parenteraler Einverleibung von Eiweißkörpern nicht nur die Beeinflussung der Zellen des infizierten Organismus, sondern auch die der Infektionserreger bei der Beurteilung des Effektes zu berücksichtigen. Die von anderen Gebieten herübergenommenen, in letzter Zeit auch hier vielfach verwendeten Begriffe „Hormone" oder „Vitamine" wurden absichtlich vermieden. Sie sind zum mindesten überflüssig, wenn nicht irreführend und legen uns in ihrer ursprünglichen Bedeutung auf Wirkungsmechanismen fest, die wir bei den im Körper entstehenden aktivierenden Spaltprodukten noch nicht kennen[1]).

Der Begriff der aktivierenden Spaltprodukte ist genau festgelegt. Ihre Wirkung besteht in einer Umstimmung der Zellen oder ihrer Funktionseinheiten, so daß sie nunmehr auf Reize, auf die sie vorher nicht reagierten, ansprechen. Diese Umstimmungen sind durchaus unspezifischer Natur und es besteht ein gewisser Gegensatz zur spezifischen Sensibilisierung. Dagegen können spezifisch eingestellte Zellen durch unspezifische Reize zu spezifischen Leistungen angeregt werden.

Nachdem R. Pfeiffer im Jahre 1893 den Influenzabazillus entdeckt und seine Eigenschaften in grundlegenden Arbeiten festgelegt hatte, sind besonders während der letztjährigen Grippeepidemieen von amerikanischer Seite ausgedehnte Studien über sein Verhalten auf Blutnährböden ausgeführt worden.

Es soll hier unter Hinweis auf die Darstellungen R. Pfeiffers, P. Huebschmanns und M. Knorrs in Bd. V und VI der Weichardtschen Ergebnisse nicht darauf eingegangen werden.

Wir wollten untersuchen, ob unsere abiureten N-haltigen Extrakte geeignet sind, auch derartige anspruchsvolle Mikroorganismen, wie die Influenzabazillen, zu aktivieren, so daß sie auf Nährböden, die ihnen sonst nicht zusagen, gedeihen.

Als Stämme verwandten wir absichtlich solche der verschiedensten Herkunft. Die einen stammten aus dem Institut von Geh.-Rat R. Pfeiffer, die anderen aus unserer bakteriologischen Untersuchungsanstalt, sie waren von Priv.-Doz. Dr. Knorr gezüchtet[2]).

Für die Influenzabazillen kann man unbedenklich feste Agarnährböden benutzen, denn bei ihnen ist die Gefahr, daß geringe Spuren des im Agar befindlichen Stickstoffgehaltes wesentlich das Resultat beeinflussen, gering.

Wir verwandten $1^1/_2$ Proz. Wasseragar ohne Pepton, dem wir zunächst 0,25 Proz. unseres Extraktes zusetzten. In den ersten Versuchen fügten wir noch, um diese unseren früheren anzugleichen, 1 Proz. Natrium asparag. und 1 Proz. Glyzerin zu. Ferner enthielt der Agar 0,5 Proz. Kochsalz. Das Extrakt war in Tyrode (ohne Traubenzucker) gelöst. Wider Erwarten fand ein ziemlich reichliches Wachstum statt, das in derselben Stärke bis zur 7. Generation ohne jeden weiteren Zusatz fortgeführt werden konnte. Erst dann fing das Wachstum an schwach zu werden. Als Ursache vermuteten wir einen gewissen Mangel an eisenhaltigem Katalysator, und in der Tat wurde unsere Vermutung durch das Experiment bestätigt: Wir fügten im Autoklaven $^1/_2$ Std. auf 120° erhitztes Blut (5 Proz.) zu dem Nährboden.

1) Hormone sind in ihrer ursprünglichen Bedeutung „spezifische" Sekrete innersekretorischer Organe; Vitamine Ergänzungsstoffe.

2) Für ihre Ueberlassung danken wir bestens.

Agar + erhitztes Blut ohne Extrakt diente stets als Kontrolle und es konnte naturgemäß niemals Wachstum darauf beobachtet werden. Es trat aber reichliches Wachstum ein, wenn 0,25 Proz. unseres Extraktes zugefügt worden war. Die aus Mangel an eisenhaltigem Katalysator spärlich wachsenden Stämme erholten sich auf diesem Nährboden rasch. Wir züchteten die Stämme bis zur 15. Generation weiter und brachen dann freiwillig ab.

Der Vorteil des Arbeitens mit abiureten alkohol-wasserlöslichen Extrakten besteht, wie bereits erwähnt, vor allen Dingen darin, daß man eine quantitativ wägbare, stets gleichmäßig herzustellende wirksame Substanz zur Verfügung hat und so klare Versuchsbedingungen schaffen kann. Demgegenüber stellen wässerige Extrakte meist vollkommen undefinierbare Gemische von Salzen und organischen Substanzen dar.

Konzentrationsversuche, wie wir sie mit Diphtheriebazillen unter Verwendung flüssiger Nährböden, aus denen später Zählplatten gegossen wurden, anstellten, konnten wir hier nicht ausführen, weil uns die Beurteilung lediglich nach der Stärke des Wachstums kein exaktes Maß zu sein scheint. Immerhin läßt sich auch hier im großen und ganzen feststellen, daß große Dosen von unseren aktivierenden Extrakten hemmend wirken und in mittleren Konzentrationen ein Optimum der Wachstumsförderung vorhanden ist. Die verschiedenen Influenzastämme verhielten sich den Konzentrationen unseres Extraktes gegenüber sehr verschieden. Daß große Mengen von Spaltprodukten, wie sie z. B. in Eiterherden im Tierkörper auftreten, auf das Bakterienwachstum hemmend wirken, ist durchaus verständlich. Bekanntlich sind es meist die Randpartien, welche den Infektionserregern günstige Wachstumsbedingungen bieten. Hier sind die aktivierenden Spaltprodukte in großer Verdünnung vorhanden.

Für quantitative Bindungsversuche in vitro ist es vor allem wesentlich, sich chemisch charakterisierbarer, wägbarer Substanzen zu bedienen. Derartige Bindungs- und Beeinflussungsversuche sind bereits früher in weitgehender Weise von Weichardt und Schwenk ausgeführt worden durch Bindung von Eiweißspaltprodukten an eine Reihe chemisch definierbarer Körper. Als Reagens wurde die charakteristische Beeinflussung des Temperaturzentrums gewählt.

Durch Elektrolyse hergestellte Eiweißspaltprodukte wurden in vitro mit wirksamen bindenden Gruppen zusammengebracht. Standen solche zur Verfügung, so erfolgte keine Beeinflussung des Temperaturzentrums nach Injektion von Mäusen, die in charakteristischer Weise eintrat, wenn die Eiweißspaltprodukte allein gewirkt hatten. Besonders wirksam im Sinne einer Entgiftung erwiesen sich Acetonextrakte aus getrockneten Dialysaten von Seren (Retardine = Hemmungskörper).

Mit derartigen Hemmungskörpern fütterte nun Fluhrer Ziegen, denen er eine bestimmte Menge Tuberkelbazillenemulsion ins Euter injiziert hatte, monatelang. Die gefütterten Tiere zeigten den Kontrollen gegenüber eine geringere Ausbreitung des tuberkulösen Prozesses und Fluhrer führte das auf die Hinwegnahme der das Bakterienwachstum aktivierenden Spaltprodukte zurück. War auch hier ein Unbeteiligtsein der Körperzellen nicht vollkommen auszuschalten, so war doch bei chronischer Infektion dieser Beeinflussungsmechanismus durch solche Versuche wahrscheinlich gemacht und Weichardt hielt es für möglich, daß gute Erfolge durch gewisse Nahrungsmittel, die bei chronischen Infektionen berichtet werden, auf diesen Mechanismus zurückgeführt werden können.

Ob bei akuten Infektionen, die durch Endotoxine wirken, ein derartiger humoraler Mechanismus eine wesentliche Rolle spielt, erscheint zweifelhaft.

Neuere Versuche über die Ausschaltung von Wuchsstoffen bei Influenzabazillen liegen von Terada vor. Er fand, daß die meisten Tiersera die Eigenschaft haben, wachstumsfördernde Stoffe der Influenzabazillen zu vernichten. Bei einem kranken Tiere fand er diese Wirkung nicht. Er denkt dabei an verdauende Eigenschaften dieser Sera. Allerdings fällt auf, daß die Stoffe, welchen die vernichtende Wirkung dieser Sera innewohnt, in ihrem physikalischen Verhalten den bisher bekannten Alexinen recht ähnlich sind. Immerhin ist der von Terada angenommene Mechanismus möglich. Wir haben uns zunächst darauf beschränkt, die wachstumshindernde Wirkung verschiedener Tiersera, wie sie Terada fand, auch bei Verwendung unserer exakt dosierbaren Extrakte festzustellen.

Wir beimpften Platten, die einmal nach der oben beschriebenen Weise, jedoch ohne Extrakt hergestellt worden waren, mit Verreibungen von I.B. in Kochsalzlösung. Anderen setzten wir 0,1 Proz. Extrakt zu, und zuletzt gossen wir noch solche mit gleicher Menge Extrakt, das jedoch einige Stunden zuvor mit Hammelserum oder Pferdeserum zu gleichen Teilen vermengt worden war.

Versuch mit Hammelserum.

Stamm	I W.-Agar ($1^1/_2$ %) + 5 % Blut $^1/_2$ Std. bei 120° erhitzt	II I. + 0,1 % Extrakt	III I. + 0,1 % Extr. mit Hammelserum 3 Std. gebunden
John	—	++(+)	—
B. P- IV	—	+	—
III	—	++	—
938	—	+++	—
1253	—	+++	—
M 14	—	±	—
8026	—	+++	—
8030	—	+++	—

Versuch mit Pferdeserum.

Stamm	I W.-Agar ($1^1/_2$ %) + 5 % Blut $^1/_2$ Std. bei 120° erhitzt	II I. + 0,1% Extrakt	III I. + 0,1% Extr. mit Pferdeserum 2 Std. gebunden
John	—	+++	—
B. P. IV	—	++	—
III	—	+++	—
938	—	+	—
1253	—	+++	—
M 14	—	+++	—
8026	—	+++	—

Man sieht aus beiden Tabellen, daß sowohl durch Hammel- wie Pferdeserum eine vollständig hemmende Wirkung festzustellen ist.

Knorr hat in der bakteriologischen Untersuchungsanstalt Erlangen mit den bisher gebräuchlichen Nährmitteln die Befunde Teradas bestätigt und erweitert. Bei vielen Menschen sowie Tauben fand er keine hemmende Wirkung. Ob dieses Versagen humoraler Serumwirkung beim normalen unvorbehandelten Tiere, mag es nun als Fehlen

direkter Alexinwirkung oder als Hinwegnahme von Wuchsstoffen zu deuten sein, für akute Infektionen wesentlich ist, schien uns wichtig.

Wir haben Sera von Tauben mit 0,1 ccm unseres Extraktes einige Std. binden lassen und danach dem Agar zugegeben. Es zeigte sich, daß Taubenserum eine hemmende Wirkung auf das Wachstum der IB. auch bei Verwendung unserer gut dosierbaren Extrakte nicht besitzt.

Versuch mit Taubenserum.

Stamm	I W.-Agar (1½ %) + 5 % Blut, ½ Std. bei 120° erhitzt	II I. + 0,1 % Extrakt	III I. + 0,1 % Extr. mit Taubenserum 1½ Std. gebunden
John	—	++	++
III	—	++	+
938	—	+++	+++(+)
1253	—	++	++
M 14	—	++	++
8026	—	++	++(+)

Es liegt also, das kann mit Sicherheit gesagt werden, hier eine absolute humorale Schutzlosigkeit vor, gleichgültig auf welchem Mechanismus dieselbe beruhen mag.

Interessant war es nun, festzustellen, ob diese humorale Schutzlosigkeit auch einer solchen des lebenden Tieres entspricht. Wir injizierten also Tauben mit verschiedensten, auch frisch aus dem Körper gezüchteten Stämmen intravenös, subkutan, intramuskulär, intraperitoneal und intratracheal. Irgendwelche krankmachende Wirkung haben wir nicht gesehen, obgleich wir ganze reich gewachsene Levinthal-Schrägagarkulturen verwendeten.

Es entspricht also die in vitro nachzuweisende humorale Schutzlosigkeit des Serums dieser Tiere nicht dem ausgesprochenen Schutze, den dieselben gegen die verwendeten Bazillen besitzen.

Nach den vielfach jetzt vorliegenden Erfahrungen kommt der Zelle, vor allen Dingen der des reticulo-endothelischen Systems, die weitaus wesentlichste Funktion bei der Abwehr der Erreger akuter Infektionen zu. Die Literatur auf dem Gebiete der Proteinkörpertherapie zeigt uns, daß jede Störung in dem kolloidalen Gleichgewicht der Körpersäfte mit einer Aktivierung der Körperzellen, d. i. einer Steigerung der verschiedenartigsten Fermentfunktionen, beantwortet wird. Diese Reaktion dürfte die erste und wirksamste Abwehr gegen die eingedrungenen Erreger sein. Ihr kann später die spezifische Reaktion der Bildung spezifischer Abwehrstoffe folgen. Bei unseren Tauben, die unbehandelt humoral durchaus nicht reagierten, konnten wir nach 3maliger intravenöser Injektion von 24stünd. Levinthal-Schrägagarkulturen deutliche Bakterizidie des Serums nicht nachweisen. Es ließ sich lediglich ein Agglutinintiter von 1600 feststellen.

Wir kommen deshalb zu folgenden Schlußfolgerungen:

1. Auch bei Verwendung gut dosierbarer abiureter alkohol-wasserlöslicher Wuchsstoffe läßt sich die prinzipielle Richtigkeit der Angaben Teradas erweisen, wonach die meisten Tiersera auf das In-

fluenzabazillenwachstum stark hindernd wirken. — 2. Der von Fluhrer und Weichardt vor Jahren angenommene Schutz gegen chronische Infektion, welcher darin besteht, daß den Infektionserregern Wuchsstoffe durch geeignete Gruppen entzogen werden, ließ sich für die verwendeten akute Infektionen erzeugenden Erreger nicht nachweisen, denn: 3. Die humorale Schutzlosigkeit der Tauben gegen Influenzabazillen entspricht nicht einer Schutzlosigkeit des lebenden Tieres gegen diese Erreger. — 4. Die erste wirksame unspezifische Abwehrreaktion bei akuten Infektionen liegt zweifellos in einer Aktivierung der Körperzellen, die nach jeder Störung des kolloidalen Gleichgewichts der Körpersäfte eintritt.

Literatur.

Petersen-Weichardt, Proteintherapie und unspezifische Leistungssteigerung. Berlin (J. Springer) 1923. — Weichardts Ergebnisse. Bd. 5. S. 1, 19 u. 275; Bd. 6. S. 350. — Weichardt-Schwenk, Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 83. H. 5. S. 381, und Ztschr. f. Immunitätsf. u. exper. Therapie. Bd. 19, H, 5, S. 528. — Weichardt-Scholz, Klin. Woch. 1923. S. 2305; 1924. S. 839. — Fluhrer, Centralbl. f. d. ges. Physiol. u. Pathol. d. Stoffwechsels. 1909. S. 7. — Weichardt, Kolle-Wassermann Handb. 2. Aufl. Bd. 2. S. 1521. Terada, The Kitasato Archives of experimen. Medicine. Vol. V. No. 1. 1922. S. 34. — M. Knorr, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 92. H. 5/6. u. Bd. 94. H. 6. — W. Kollath, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 93. S. 506.

Ein Zinknitratthermostat.

[Aus Statens Serum Institut, Kopenhagen (Direktor: Th. Madsen).]

Von **Martin Kristensen,** Abteilungsvorsteher.

Mit 2 Abbildungen im Text.

Wir standen vor ein paar Jahren im Seruminstitut vor der Aufgabe, einen Thermostaten für bakteriologische Zwecke nach Grönland zu schaffen. Da zu seiner Erwärmung möglichst keine anderen Brennstoffe wie Tran benutzt werden sollten, und da der Thermostat möglichst wenig Beaufsichtigung erfordern sollte, wurde der Gedanke an eine (direkte) Erwärmung aufgegeben und man wählte als Wärmequelle die Wärme eines kristallinischen Stoffes, die dieser abgibt, indem er erstarrt.

In der Literatur scheinen nur wenige rationelle Verfahren dieser Art beschrieben worden zu sein, so z. B. die Verwendung einer Lösung von essigsaurem Natron, welche während der Abkühlung nach und nach auskristallisiert. Die rationellste Methode nämlich, die Anwendung eines reinen Stoffes (keiner Lösung) mit einem Schmelzpunkt (= Erstarrungspunkt) von ungefähr 37° (essigsaures Natron schmilzt erst bei bedeutend höherer Temperatur) habe ich nicht beschrieben gesehen, womit aber nicht gesagt sein soll, daß sie nicht doch schon früher angewandt worden ist.

Nach Durchsicht des Chemikerkalenders wählte ich Zinknitrat [Zn$(NO_3)_2$, 6 H_2O] als einzigen Stoff, der in Frage kam. Sein Schmelzpunkt wird in der Ausgabe von 1924 mit 36,4^0 angegeben. (Für Na_2HPO_4 12 H_2O wird in den älteren Ausgaben ein Schmelzpunkt von 38^0 angegeben, aber Versuche zeigten, daß es ungeeignet ist.)

Die Wirkung dieses Salzes wird am besten in einem Abkühlungsversuch im Reagensglas demonstriert, dessen Resultat in Figur 1 angeführt ist:

In 2 Reagenzgläsern von ca. 2 cm inwendigem Diameter wurden gleich große Volumen (ca. 15 ccm) warmen Wassers und geschmolzenen Zinknitrats gegossen, und in jedes der beiden Röhrchen wurde ein Thermometer gebracht. Die Gläser wurden senkrecht aufgehängt, so daß sie von allen Seiten von Luft umgeben waren. Die Zimmertemperatur betrug 22^0 C. Auf dem Diagramm (Fig. 1) sind die Zeiten als

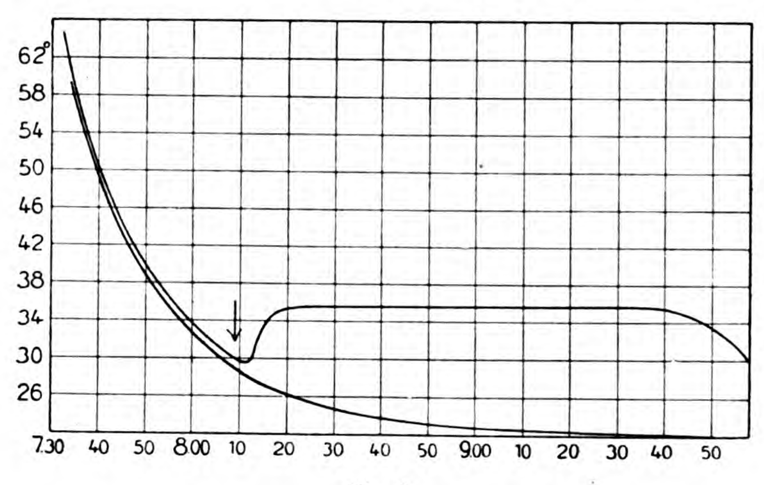


Fig. 1.

Abszisse, die Temperatur als Ordinat angeführt. Die untere Kurve gibt die Wassertemperatur, die obere die des Salzes an. Man sieht, wie die Kurven einander folgen, bis um 8,09 h. ein kleines Zinknitratkristall in das Röhrchen mit dem gleichen Salze gegeben wurde. Hierdurch wurde die Erstarrung eingeleitet, und die dadurch freigewordene Wärme bewirkte, daß die Temperatur zunächst bis zum Schmelzpunkt stieg und sich dann konstant hielt bis alles Salz erstarrt war. Von dem Augenblick an, in dem die Temperatur zuerst 37^0 überstieg, bis zu dem, in dem sie zum letzten Male 34^0 passierte, verliefen für das Salz 115 Min., für das Wasser nur 5 Min.

Fig. 2 zeigt die Einrichtung des Thermostaten. Zwischen einem größeren und einem kleineren emaillierten Eimer befinden sich 3 kg Zinknitrat (*Z*). Bei den letzten Thermostaten, die angefertigt wurden, wurde dies mit Paraffinöl (*P*) überschichtet, um zu verhindern, daß das Salz die Luftfeuchtigkeit aufsaugt. Zinknitrat ist nämlich etwas hygroskopisch, was beim Versand und der Aufbewahrung berücksichtigt werden muß. Bei Zimmertemperatur soll es aus trockenen, klaren Kristallen bestehen. Das Ganze ist von einer Hülle umgeben, die aus einer

Pappschachtel besteht, deren doppelte Wände, Boden und Deckel mit zusammengeballtem Zeitungspapier ausgefüllt sind, oder besser mit Watte, die sich bei vergleichenden Versuchen als besser isolierend erwies. Am Boden ist ein hölzernes Kreuz angebracht (das am besten nach oben keilförmig zugespitzt wird, damit es nicht zu viel Wärme fortleitet), das die Pappfläche trägt, auf der die Eimer stehen. Das Ganze kann mit einer Vorrichtung von Zinkbändern oder ähnlichem zum Tragen versehen werden. Auf eine bestimmte äußere Ausstattung wurde kein Gewicht gelegt. Einer der Vorteile des angewandten Prinzips ist der, daß jeder sich einen solchen Thermostaten leicht selbst herstellen kann.

Wenn der Thermostat in Betrieb gesetzt werden soll, werden die Eimer (mit Deckel) aus der Hülle entfernt und in einen Bottich mit Wasser, das zum Kochen gebracht wird, gestellt. Nach etwa $^1/_2$ Std. ist das Salz geschmolzen, worauf der ganze Apparat aus dem Bottich auf einen Tisch gebracht wird (oder in lauwarmes Wasser), bis die Temperatur des Salzes bis auf ca. 40° C gefallen ist. Nach sorgfältigem äußeren Abtrocknen wird der Apparat wieder in die Hülle hineingesetzt und sowohl Kulturröhrchen wie Widal-Reaktionen usw. können alsdann in den inneren Raum gestellt werden, worauf der Deckel des großen Eimers und der der Hülle aufgesetzt wird. Die Temperaturverhältnisse im inneren Raum sind mehrmals untersucht worden mit folgendem Hauptergebnis: Wenn der Thermostat in einem Raume von 15—20° C steht, hält sich die Temperatur für ca. 24 Std. zwischen 35 und 33° C. Will man den Thermostaten mehrere Tage hintereinander benutzen, so muß das Salz jeden Tag von neuem geschmolzen werden. Während dieses Prozesses müssen die Bakterienkulturen usw. natürlich jedesmal aus dem Apparat entfernt werden.

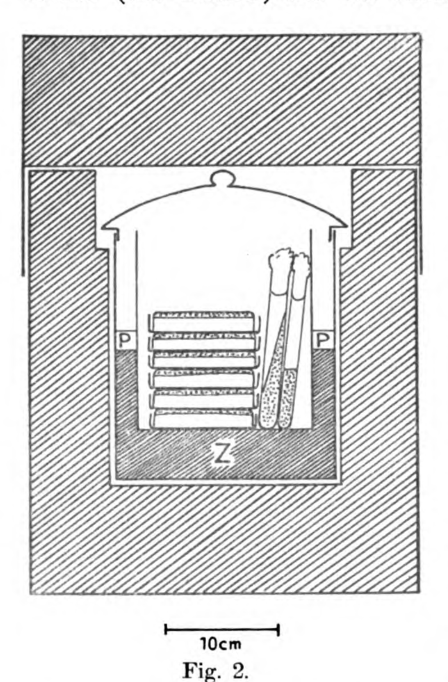


Fig. 2.

Vorübergehende Unterkühlung (d. h. die Erscheinung, daß die Erstarrung ausbleiben kann trotz Abkühlung unter dem Schmelzpunkt) kann freilich beobachtet werden, aber die Kristallisation ist doch immer eingetreten, ohne daß es notwendig war, kristallisiertes Salz zuzusetzen. Die größere vorhandene Salzmenge und die größere Oberfläche, mit der sie in Berührung ist, sind sicher der Grund, daß die Unterkühlung nicht einen so hohen Grad erreicht, wie bei Versuchen in Reagenzgläsern. Selbstverständlich kann die Unterkühlung aber niemals bewirken, daß eine selbst noch so kleine Menge der Erstarrungswärme vermißt wird, nachdem erst einmal der Kristallisationsprozeß eingesetzt hat.

Sehr wichtig ist es, daß die Hülle nicht der Feuchtigkeit aus-

gesetzt wird; sollte dies aber doch einmal der Fall sein, so muß sie vor dem Gebrauche gut getrocknet werden.

Der beschriebene Thermostat hat sich in solchen Fällen sehr nützlich erwiesen, in denen man einen transportablen Thermostaten benötigte. Zum Beispiel sollte im April 1924 eine Umgebungsuntersuchung von mehr als 300 gesunden Personen (hauptsächlich Soldaten) wegen Auftretens von Meningitis in der Garnison in Aarhus vorgenommen werden. Von Kopenhagen wurden 3 Thermostate und die nötige Anzahl von Schräg-Aszitesagarröhrchen mitgeführt. Bei der Ankunft in Aarhus wurde der Inhalt der Thermostaten geschmolzen, und die Röhrchen wurden nach Beimpfung hineingestellt. Ferner wurden einige Röhrchen mit Spinalflüssigkeit von einem Kranken beschickt. Das Ganze wurde in der darauffolgenden Nacht mit Dampfschiff nach Kopenhagen zurückbefördert. Bei der Ankunft im Seruminstitut am nächsten Vormittag fanden sich bereits 1—2 mm große Meningokokkenkolonien sowohl in den Röhrchen, die von dem Kranken stammten, als auch in einem großen Teil der Röhrchen, die von Gesunden beimpft waren. Nach weiterem 24stünd. Aufenthalt im Brutschrank bei 37° wurde die eigentliche Untersuchung vorgenommen. Bei 89 von 332 untersuchten Personen fanden sich Meningokokken.

Ferner wurden folgende Stichproben für die Brauchbarkeit des Thermostaten gemacht: 1) Die Aussaat von Typhus- und Paratyphusbazillen auf Drigalski-Agar war nach 24stünd. Aufenthalt im Thermostaten gut gewachsen. 2) 9 Widal-Reaktionen wurden doppelt untersucht, einmal im gewöhnlichen Brutschrank bei 37°, einmal im Zinknitratthermostat (Temperatur 35°). Sämtliche Reaktionen wurden nach 24 Std. mit folgenden Resultaten abgelesen: 5 Sera gaben in beiden Fällen gleichstarke positive Reaktionen für Typhus, ein Serum gleichstarke Reaktion für Paratyphus, und 3 waren in beiden Fällen negativ. 3) Endlich wurden 8 Diphtheriepatienten untersucht. Mit jedem Tupfer wurden 4 Loeffler-Serumröhrchen beimpft, von denen je 2 in den gewöhnlichen 37°-Brutschrank gestellt wurden und 2 in den Zinknitratthermostaten, dessen Temperatur unmittelbar, bevor die Röhrchen hineingestellt wurden, 40° betrug. Nach 18 Std. Bebrütung wurden alle 32 Röhrchen untersucht. Die Temperatur des Zinkthermostaten betrug alsdann 35° C. In beiden Serien erwiesen sich beide Proben von 5 Patienten als positiv, während beide Proben von den übrigen 3 Patienten negativ waren. Weder in Bezug auf makroskopisches Aussehen der Kulturen noch in Bezug auf die mikroskopische Untersuchung fanden sich Unterschiede zwischen den Röhrchen, die in den verschiedenen Thermostaten bebrütet waren. Wenn man außerdem in Betracht zieht, daß die Temperatur von 37° C, wie von einigen behauptet wird, wahrscheinlich über der optimalen Temperatur für Diphtheriebazillen liegt, und daß diese noch bei ca. 22° C in Reinkultur wachsen (was bei Meningokokken niemals der Fall ist), so kann man für die Züchtung von Diphtheriebazillen den Zinkthermostaten sicher unbedenklich empfehlen. Es ist empfehlenswert, wenn auch nicht von bebesonderer Wichtigkeit, die Temperatur des Thermostaten auf ca. 40° C zu bringen, bevor man ihn in Gebrauch nimmt; bis die Kulturen durchgewärmt sind, ist diese Temperatur wahrscheinlich bis auf 37° gesunken. Wenn sich die Temperatur während der Bebrütung auf 35° hält, braucht man sicher nicht mit längerer Bebrütungszeit für die Kulturen zu rechnen, wie man sie für den 37°-Brutschrank ansetzen

würde. Sollte die Temperatur bis auf 33° sinken, so kann es möglicherweise notwendig werden, die Bebrütungszeit um einige Stunden zu verlängern.

Wenn der Thermostat für Widal-Reaktionen verwendet werden soll und nicht gleichzeitig für Bakterienzüchtung, so ist es am besten, mit einer Temperatur von ca. 55° C anzufangen, da die Agglutination bekanntlich ihr Optimum um 50° hat. Sollte man speziell einen Thermostaten für Widal-Reaktionen gebrauchen, so könnte man vielleicht statt Zinknitrat Natriumthiosulfat (Fixiernatron) anwenden, dessen Schmelzpunkt bei 48° liegt. Freilich ist dies weniger empfehlenswert. Versuche mit gewöhnlichem Fixiernatron zeigten, daß selbst dieses unreine Salz einen scharfen Schmelzpunkt von 48° und eine ausreichende Schmelz- (Erstarrungs-) Wärme besaß. Es hat aber eine sehr ausgesprochene Neigung zur Unterkühlung, und selbst nachdem der Kristallisationsprozeß schon eingeleitet ist, schreitet er ziemlich langsam vor. Wenn auch dieses zuletzt genannte Salz aus dem eben angeführten Grunde im allgemeinen nicht empfehlenswert ist, so ist es doch vielleicht nicht ausgeschlossen, daß man es in gewissen Fällen mit Vorteil verwenden kann.

Druckfehlerberichtigung.

In dem Aufsatz Sdrodowski und Brenn, Zur Pathogenese der Cholera (Centralblatt f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. 94. Heft 3/4) S. 155 Zeile 4 von unten lies: **enteraler statt parenteraler**, S. 156, Zeile 22 von oben **Totenstarre statt Fäulnis**, Zeile 26 von oben **Omentum statt Rektum**, S. 158, Zeile 5 von unten ebenfalls **Omentum statt Rektum**.

Inhalt.

Inhaltsverzeichnis.

I. Verzeichnis der in Band 94 enthaltenen Arbeiten.

II. Sachverzeichnis.

III. Verzeichnis der Abbildungen.

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena — 5299.

Centralblatt
für
Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten

Erste Abteilung: Medizinisch-hygienische Bakteriologie und tierische Parasitenkunde

Originale

In Verbindung mit

Prof. Dr. R. Abel, Geh. Obermed.-Rat, Jena
Prof. Dr. M. Braun, Geh. Reg.-Rat, Königsberg i. Pr.
Prof. Dr. R. Pfeiffer, Geh. Med.-Rat, Breslau

herausgegeben von

Geh. Reg.-Rat Prof. Dr. O. Uhlworm, Bamberg, Kunigundendamm 61 II
Präsident Dr. A. Weber, Dresden-N. 6, Wilhelmplatz 4 II

und

Prof. Dr. E. Gildemeister, Ob.-Reg.-Rat, Berlin-Lichterfelde W, Victoriastr. 7

Verlag von Gustav Fischer in Jena

94. Band — Jena, 1. Mai 1925 — Heft 7/8

— Jeder Band umfaßt 8 Hefte, die in zwangloser Folge erscheinen. —

Ausbildungs-Lehrgang für approbierte Ärzte und Tierärzte im Institut für Infektionskrankheiten „Robert Koch“

Der Lehrgang findet in der Zeit vom 1. Oktober bis Weihnachten 1925 statt. Täglich 10—3 Uhr Vorträge und Übungen. Außerdem Ausflüge zur Besichtigung hygienisch wichtiger Einrichtungen. Die zu behandelnden Lehrgebiete sind: Seuchenbekämpfung, Bakteriologie, Serologie, spezifische Diagnostik, Immunitätslehre, Protozoenkunde, Tropenmedizin, Desinfektion, hygienisch-chemische Untersuchungen, Mikrophotographie.

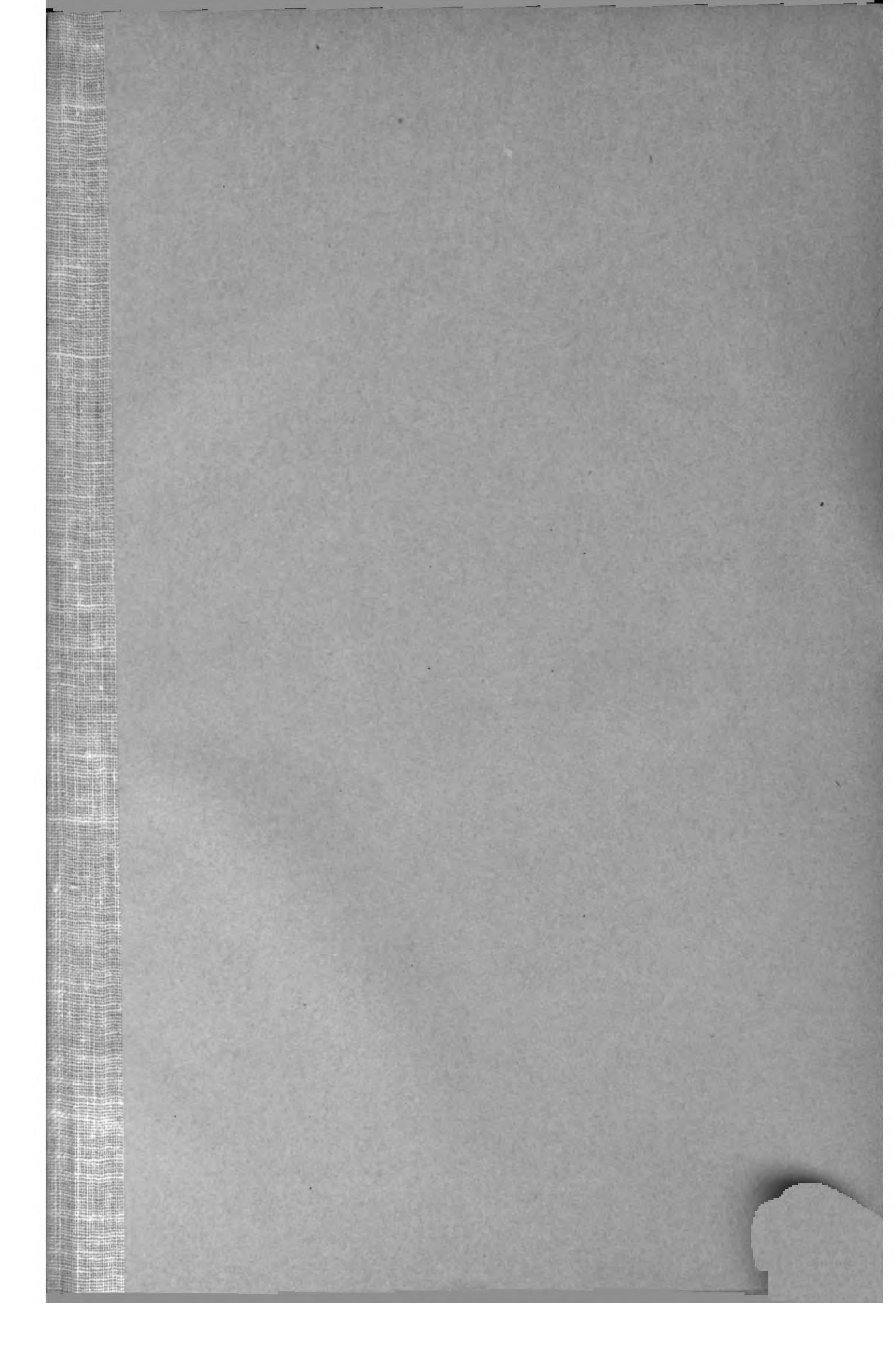
Am Unterricht beteiligen sich die Herren: **E. Boecker, H. A. Gins, F. K. Kleine, J. Koch, B. Lange, G. Lockemann, R. Otto, O. Schiemann, Cl. Schilling, E. Zettnow.**

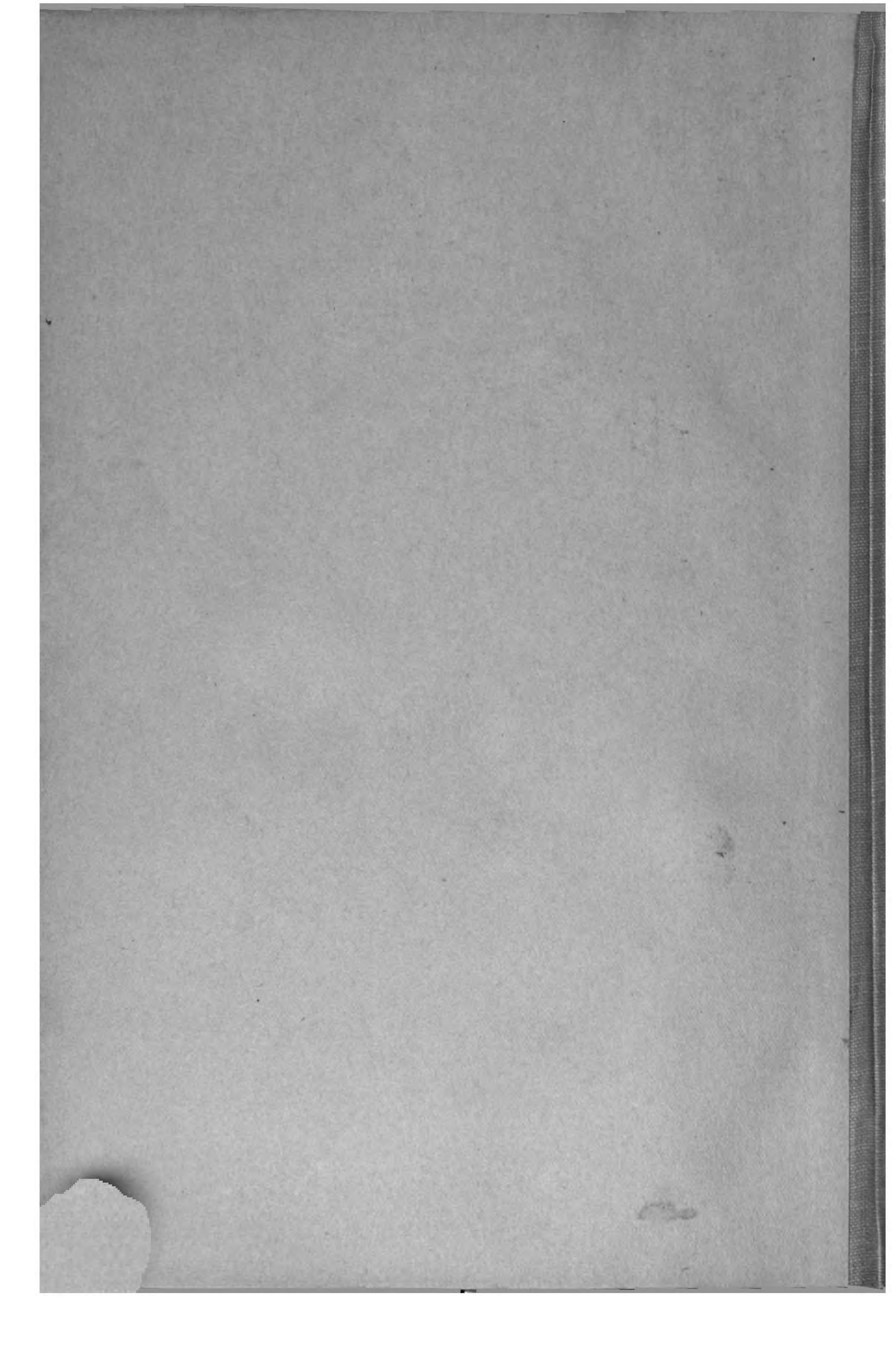
Die Teilnahme an dem Lehrgang wird für die Kreisarzt- und Kreistierarztprüfung angerechnet. **Anmeldefrist bis 15. September 1925.** Nähere Auskunft erteilt die Geschäftsstelle des Instituts für Infektionkrankheiten **„Robert Koch“, Berlin N. 39,** Föhrerstraße 2.

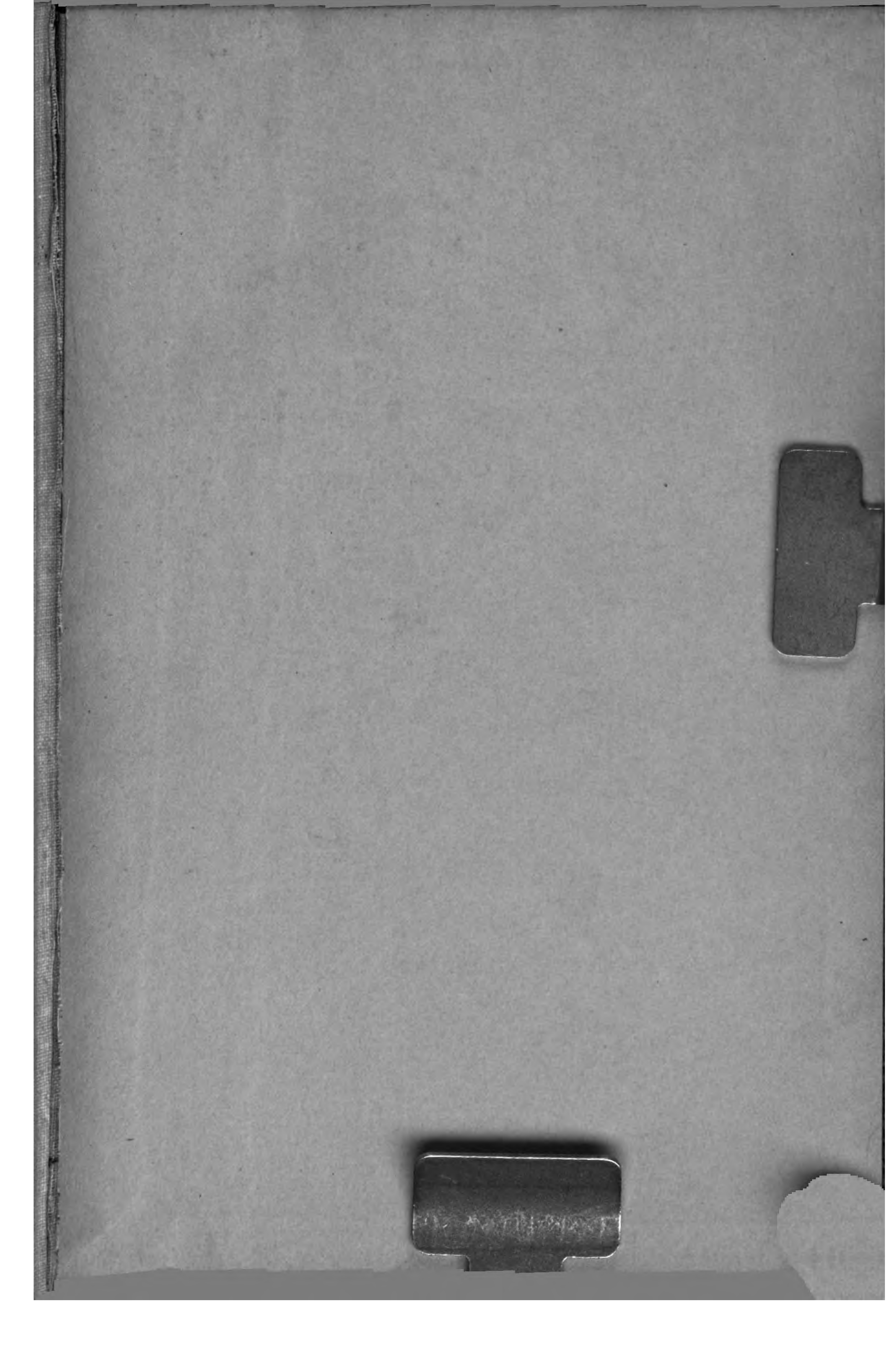
☞ Diesem Hefte liegt ein Prospekt bei von **Theodor Steinkopff, Dresden** und **Leipzig**, über: **„Allgemeine technische Mikrobiologie"** von Prof. Dr. Alex. Janke.

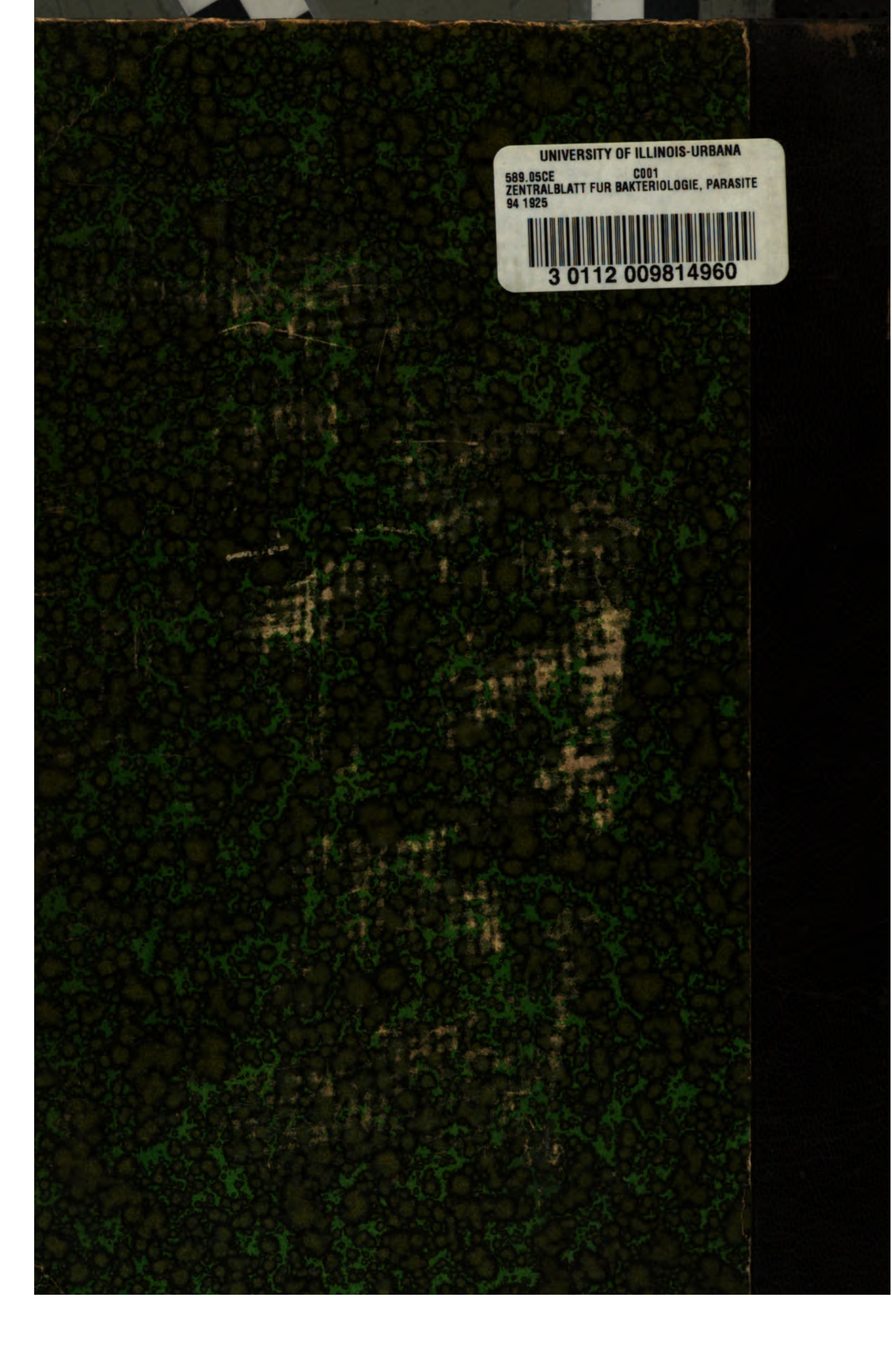











UNIVERSITY OF ILLINOIS-URBANA
589.05CE C001
ZENTRALBLATT FUR BAKTERIOLOGIE, PARASITE
94 1925
3 0112 009814960